

**Studien zur DNA-Vakzinierung von Hühnern mit *Eimeria tenella*-  
Antigenen**

**D i s s e r t a t i o n**

zur Erlangung des akademischen Grades  
d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m  
(Dr. rer. nat.)  
im Fach Biologie  
eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
der Humboldt-Universität zu Berlin  
von

Diplom-Biologe Christian Klotz  
geboren am 24. Juni 1970 in Grünstadt

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin  
Prof. Dr. Jürgen Mlynek

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
Prof. Thomas Buckhout, PhD

Gutachter:

1. Prof. Dr. Richard Lucius
2. Prof. Dr. Wolfgang Uckert
3. PD Dr. Frank Seeber

Tag der Einreichung: 29.11.2004

Tag der mündlichen Prüfung: 21.02.2005

Hiermit erkläre ich, dass ich die Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Berlin, den 29.11.2004

## Danksagung

Ich möchte mich bei allen herzlich bedanken, die mich bei der Arbeit unterstützt haben und die dazu beigetragen haben, dass die Zeit am Institut für Molekulare Parasitologie eine schöne und wertvolle Erinnerung bleibt.

Herrn Prof. Dr. Richard Lucius danke ich für den Zuspruch und für die freundliche Unterstützung während der gesamten Arbeit und für die Möglichkeit, die Dissertation am Lehrstuhl für Molekulare Parasitologie durchführen zu können. Insbesondere gilt mein Dank der großzügigen Unterstützung meines USA-Aufenthaltes in Woods Hole im Rahmen des Sommerkurses "Biology of Parasitism", der mir weitreichende theoretische und praktische Einblicke in die moderne (parasitologische) Forschung erbrachte.

Herrn Dr. Thomas Pogonka danke ich für die hervorragende fachliche und freundschaftliche Betreuung und fortwährende Unterstützung der Arbeit, sowie für die vielen hilfreichen Anregungen und Diskussionen.

Herrn PD Dr. Frank Seeber und Prof. Dr. Wolfgang Uckert danke ich für die Bereitschaft die Arbeit zu begutachten.

Herrn PD Dr. Paul Selzer und Dr. R. Marhofer danke ich für die Zusammenarbeit bei der computergestützten Analyse der *E. tenella*-Datenbank und für die Überlassung der Rohdaten.

Ich danke allen Mitarbeitern des Instituts für die freundliche Arbeitsatmosphäre und hilfreiche Unterstützung. Insbesondere danke ich Karin Biermann für die professionelle Tierpflege. Vielen Dank an Babila, Flo, Katja, Oliver und Svenja, für die tatkräftige Unterstützung bei den Immunisierungen.

Ich danke meiner lieben Familie und meinen Freunden.

<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>8</b>
<b>1      Einleitung .....</b>	<b>9</b>
1.1      Biologie von <i>Eimeria tenella</i> .....	9
1.2      Bedeutung und Pathologie der Eimeriosen .....	11
1.3      Schützende Immunantwort während Eimerieninfektionen .....	11
1.3.1    Immunantwort nach Primärinfektionen .....	12
1.3.2    Immunantwort nach Reinfektionen .....	14
1.4      Kontrolle der Kokzidiose .....	15
1.4.1    Therapeutika .....	15
1.4.2    Impfstoffe und Impfstoffentwicklung gegen Eimerieninfektionen .....	16
1.5      Ziele der Arbeit .....	18
<b>2      Ergebnisse .....</b>	<b>19</b>
2.1      Identifizierung sekretorischer Proteine von <i>E. tenella</i> .....	19
2.1.1    Identifizierung sekretierter Proteine mittels bioinformatischer Methoden....	19
2.1.1.1    Apikomplexaspezifische, sekretorische Proteine .....	21
2.1.1.2    Transporter-, Rezeptor- und Signalproteine .....	22
2.1.1.3    Sekretierte, enzymatisch aktive Moleküle und Matrixproteine .....	24
2.1.1.4    Analyse und Charakterisierung von TA4-ähnlichen Sequenzen .....	25
2.1.2    Identifizierung sekretierter Proteine durch experimentelle Methoden .....	28
2.1.2.1    Konstruktion einer cDNA-Bank aus <i>E. tenella</i> -Sporozoiten .....	30
2.1.2.2    Identifizierung sekretorischer <i>E. tenella</i> -Sequenzen aus Hefe- transfektanten durch funktionelle Komplementierung .....	32
2.1.2.3    Analyse der identifizierten cDNA-Sequenzen .....	34
2.2      DNA-Immunisierungsstudien mit den <i>E. tenella</i> -Antigenen SO7, TA4 und EtMIC1 bei Hühnern .....	37
2.2.1    Konstruktion der DNA-Immunisierungsvektoren und Überprüfung der Plasmide in der Zellkultur .....	38
2.2.1.1    Konstruktion und Überprüfung von Plasmiden mit den Genen für die sekretorischen <i>E. tenella</i> -Proteine SO7, TA4 und EtMIC1 .....	38
2.2.1.2    Konstruktion und Überprüfung von Vektoren mit den Hühnergenen der proinflammatorischen Zytokine chIFN- $\gamma$ und chIL-18. ....	44

2.2.2	Immunisierung von Hühnern mit Eimerien-DNA-Konstrukten und rekombinantem SO7- und TA4-Protein.....	47
2.2.3	Einfluss des Vektortypes, des Fusionspartners EGFP und koexprimierter Zytokine auf den Immunisierungserfolg mit SO7-DNA-Vakzinen .....	55
2.3	DNA-Immunisierungsstudien mit neu-identifizierten, sekretorischen <i>E. tenella</i> -Antigenen bei Hühnern .....	61
2.3.1.1	Klonierung und Überprüfung der ausgewählten sekretorischen Eimeriensequenzen im eukaryotischen Expressionsvektor pCDNA3 .....	62
2.3.1.2	DNA Immunisierung von Hühnern mit den generierten <i>Eimeria</i> -cDNA-Konstrukten .....	65
<b>3</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>68</b>
3.1	Sekretorische Eimerienproteine als Impfstoffkandidaten .....	68
3.1.1	Charakterisierung der TA4-ähnlichen Proteinsequenzen .....	74
3.1.2	Identifizierte <i>E. tenella</i> -Proteine als Impfstoffkandidaten .....	76
3.2	Immunreaktion von Hühnern nach DNA-Immunisierung.....	78
3.2.1	Proteinexpression <i>in vitro</i> .....	79
3.2.2	Analyse der Antikörperantwort nach DNA-Immunisierung zur Bestätigung des Immunisierungserfolges.....	81
3.2.3	Protektive zelluläre Immunantwort von Hühnern nach DNA-Immunisierung .....	83
3.2.4	Ausblick für alternative DNA-Applikationen und neue Immunisierungs-Strategien bei Hühnern.....	88
3.3	Resumé .....	93
<b>4</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>95</b>
4.1	Gewinnung von Parasitenmaterial .....	95
4.1.1	Passagierung von <i>E. tenella</i> in Hühnern und Gewinnung von Oozysten....	95
4.1.2	Gewinnung reiner <i>E. tenella</i> -Sporozoiten .....	95
4.1.3	Bestimmung der Oozystenzahl im Fäzes infizierter Tiere.....	96
4.2	Transformation von Plasmid-DNA in <i>E. coli</i> -Zellen .....	96
4.2.1	Identifizierung rekombinanter Bakterienklone.....	97
4.2.2	Langzeitlagerung von <i>E. coli</i> -Zellen.....	97
4.3	Transformation von <i>S. cerevisiae</i> -Zellen mit Plasmid-DNA .....	98
4.3.1	Langzeitlagerung von Hefezellen.....	98

4.4	Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren .....	99
4.4.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien .....	99
4.4.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefen.....	99
4.4.3	Isolierung von Ribonukleinsäuren.....	100
4.4.4	Isolierung von DNA aus Agarosegelen .....	100
4.4.5	Reinigung von Nukleinsäurelösung mittels Phenol/Chlorophorm- Extraktion.....	101
4.4.6	Konzentrieren von Nukleinsäuren (Ethanolpräzipitation).....	101
4.4.7	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	102
4.5	Analyse und enzymatische Veränderungen von Nukleinsäuren .....	102
4.5.1	Agarose-Gelelektrophorese .....	102
4.5.2	Restriktionsverdau von DNA.....	102
4.5.3	Ligation von DNA-Fragmenten .....	102
4.5.4	Phosphorylierung von Nukleinsäuren .....	103
4.5.5	Sequenzierung von DNA .....	103
4.5.6	Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	104
4.5.7	Reverse Transkription (RT) .....	105
4.5.8	Zweitstrang-cDNA-Synthese .....	105
4.6	Herstellung einer cDNA-Bank aus <i>E. tenella</i> -Sporozoiten .....	106
4.7	Identifizierung von sekretorischen Proteinen mittels Hefemutanten ( <i>suc2<sup>-</sup></i> , <i>trp<sup>-</sup></i> ) und Invertaseaktivitätstest.....	106
4.8	Expression und Aufreinigung rekombinanter <i>E. coli</i> -Proteine.....	107
4.9	Proteinanalytik .....	108
4.9.1	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) .....	108
4.9.2	Elektrotransfer von gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteinen auf Nitrocellulose (NC)-Membranen .....	108
4.9.3	Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels Bicinchoninsäure (BCA)-Test.....	109
4.9.4	Kopplung von myc-Peptid an BSA.....	109
4.10	Immunologische und zellbiologische Methoden .....	109
4.10.1	Immunchemischer Nachweis von Proteinen auf NC-Membran .....	109
4.10.2	ELISA .....	110
4.10.3	Isolierung und Aufreinigung von PBL und Milzzellen von Hühnern .....	110
4.10.4	IFN- $\gamma$ -Biotest mit Hilfe einer Hühnermonozytenzelllinie (HD11).....	111

4.10.5	Kultivierung von Zelllinien .....	112
4.10.6	Transformationstest mit PBL von Hühnern .....	112
4.10.7	Immunisierung von Hühnern.....	113
4.10.8	Gewinnung von Seren .....	113
4.10.9	Transfektion von eukaryotischen Zellen mit Plasmid-DNA .....	113
4.11	Computeranalysen und statistische Methoden .....	114
4.11.1	Sequenzanalyse nach der SignalP-Strategie .....	114
4.11.2	Sequenz- und Datenbankanalysen.....	115
4.11.3	Statistische Methoden .....	115
<b>5</b>	<b>Material .....</b>	<b>116</b>
5.1	Laborgeräte .....	116
5.2	Verbrauchsmaterialien.....	116
5.3	Chemikalien, Sonstiges .....	116
5.4	Kommerzielle Kits und Enzyme .....	117
5.5	Antikörperkonjugate, Immunchemikalien .....	117
5.6	Tiermaterial und permanente Zelllinien.....	118
5.7	Bakterienstämme, Hefestämme und Plasmide .....	118
5.8	Oligonukleotide, Adaptoren .....	118
5.9	Puffer, Medien und Stammlösungen.....	120
<b>6</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>126</b>
<b>7</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>128</b>
<b>8</b>	<b>Publikationen und Tagungsbeiträge.....</b>	<b>146</b>

## Zusammenfassung

Der Einzeller *Eimeria tenella* zählt zu den hochpathogenen Parasiten des Haushuhns und ist Verursacher der Blinddarm-Kokzidiose. Zur Zeit existiert noch kein Impfstoff, der auf Basis von einzelnen Antigenen wirksam ist. Insbesondere die Identifizierung und Charakterisierung von Proteinen, welche an der Parasit-Wirtszell-Interaktion beteiligt sind, könnte einen Beitrag zur Entwicklung einer Immunprophylaxe darstellen.

Über eine bioinformatische Methode wurden aus 12187 *E. tenella-expressed sequence tag* (EST) 2881 Contig-Sequenzen gebildet. Daraus konnten mittels blastx-Suche und SignalP-Analyse 84 Sequenzen extrahiert werden, die signifikante Homologien zu Proteinen mit einer N-terminalen Konsensussequenz besaßen. Aufgrund der beschriebenen Funktion und Lokalisierung dieser Proteine, wurde für 54 *E. tenella*-Sequenzen eine Beteiligung an der Wirts-Parasit-Interaktion abgeleitet.

Eine experimentelle Identifizierung von sekretorischen Proteinen aus einer Sporozoiten-cDNA-Bank mittels funktioneller Komplementierung in Hefen ergab insgesamt 25 unabhängige Sequenzen, die am N-Terminus eine Signalsequenz besaßen. Elf der 25 Sequenzen zeigten Homologien zu anderen, schon bekannten Proteinen, wovon lediglich drei schon beschriebene *E. tenella*-Proteine darstellten.

In den Analysen wurden 15 unterschiedliche Sequenzen identifiziert, die signifikante Homologien zum Hauptoberflächenprotein TA4 aufwiesen. Diese TA4-ähnlichen Proteine, deren Funktion unbekannt ist, werden vermutlich stadienspezifisch auf der Oberfläche von Sporozoiten oder Merozoiten exponiert.

Um ein DNA-Immunisierungsprotokoll für Hühner zu erarbeiten wurden die drei *E. tenella*-Antigene SO7, TA4 und EtMIC1 eingesetzt und der Einfluss von zwei unterschiedlichen DNA-Immunisierungsvektoren (pCDNA3, pVR1012) und des stabilisierenden Fusionspartners *enhanced green fluorescence protein* (EGFP) überprüft. Es konnten spezifische SO7-Antikörperreaktionen induziert werden, wobei keine auffälligen Unterschiede durch den Einsatz der beiden Vektoren oder durch EGFP-Fusion zu beobachten waren. Des Weiteren wurden 13 neu identifizierte Sequenzen in den DNA-Immunisierungsvektor pCDNA3 kloniert. Zur Überprüfung des Immunschutzes wurden nach DNA-Immunisierung Belastungsinfektionen durchgeführt. Jedoch konnten in keinem Fall reproduzierbare Reduktionen der Parasitenlast erzielt werden.



# 1 Einleitung

Parasiten der Gattung *Eimeria* sind obligat intrazelluläre Protozoen, die in einer Vielzahl von Wirten vorkommen, und den Darm oder darmassoziierte Organe besiedeln. Taxonomisch werden sie dem Subphylum Apikomplexa zugeordnet (Hausmann und Hülsmann, 96). Namensgebend und charakteristisch ist der sogenannte Apikalkomplex am Vorderpol der vegetativen Stadien. Dieser apikale Komplex besteht aus einem Organellenverband und ist wesentlich am Invasionsprozess und der Etablierung des Parasiten in der Wirtszelle beteiligt (Dubremetz et al., 98; Opitz und Soldati, 02).

Neben den Eimerien, die bei Nutztieren die bedeutsame Erkrankung Kokzidiose verursachen, gehören dieser Gruppe weitere human- und veterinärmedizinisch relevante Krankheitserreger an. Hierzu zählen zum Beispiel *Plasmodium ssp.* (Malaria-Erkrankung) und *Toxoplasma gondii* (Toxoplasmose). Insgesamt verursachen Infektionen mit Apikomplexa-Parasiten weltweit bei Mensch und Tier große Gesundheitsprobleme mit enormen ökonomischen Schäden. Deshalb wurden in den letzten Jahren große Anstrengungen unternommen, das molekularbiologische und immunologische Verständnis der Parasit-Wirts-Beziehung von Apikomplexa-Organismen zu erweitern.

## 1.1 Biologie von *Eimeria tenella*

*E. tenella* (Fantham, 09) ist eine von sieben bekannten Eimerienarten die das Haushuhn besiedeln. Der Lebenszyklus ist wie bei allen Eimerien monoxen und umfasst drei Schizogoniezyklen, eine Gamogonie und die exogene Sporogonie (Abb. 1). Aus den oral aufgenommenen Oozysten schlüpfen im Darm die infektiösen Sporozoiten und invadieren zunächst Epithelzellen an der Spitze der Blinddarmvilli. Das Endziel der *E. tenella*-Sporozoiten sind die Epithelzellen der Blinddarmkrypten, die sie vermutlich über Migration durch die Lamina propria erreichen. Zum Teil findet die Migration innerhalb von intraepithelialen Lymphozyten (IEL) statt (Lawn und Rose, 82). Die Sporozoiten wandeln sich innerhalb einer parasitophoren Vakuole zu Trophozoiten um, runden sich ab und wachsen zu mehrkernigen Schizonten heran. Nach etwa zwei Tagen ist die erste Schizogonie abgeschlossen und die freiwerdenden Merozoiten der ersten Generation infizieren benachbarte Epithelzellen

der Blinddarmkrypten. Diese infizierten Zellen schwellen an, verlieren den Kontakt zu den Nachbarzellen und gelangen durch die Basallamina in tiefer gelegenes Gewebe (Fernando et al., 83). Dort findet die zweite Schizogonie statt, die eng mit der Pathologie assoziiert ist. Aus dieser zweiten Schizogonie entstehen nach etwa fünf Tagen die Merozoiten der zweiten Generation. Diese infizieren die noch vorhandenen Enterozyten. Die Merozoiten, die aus der dritten Schizontengeneration entstehen, invadieren wiederum Epithelzellen. Aus diesen Merozoiten entstehen Mikrogametozyten und Makrogametozyten, die zu Mikro- und Makrogameten heranreifen. In den Epithelzellen verschmelzen sie zur Zygote, die sich zum Sporont weiterentwickelt. Dieser umgibt sich mit einer widerstandsfähigen Zystenhülle und wird unsporuliert mit dem Fäzes ausgeschieden. Die Sporulation der Oozysten findet bei hoher Luftfeuchtigkeit und Anwesenheit von Sauerstoff innerhalb von zwei Tagen außerhalb des Wirtes statt. Aus zunächst vier Sporoblasten entwickeln sich in der Oozyste vier Sporozysten, die je zwei Sporozoiten enthalten.

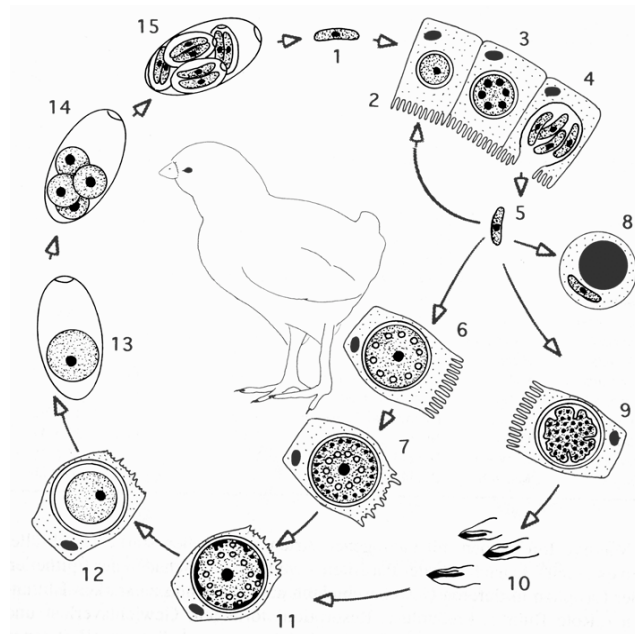


Abb. 1: Lebenszyklus von *Eimeria tenella*.

1: Sporozoit. 2: Trophozoit in Darmepithelzelle. 3: Schizont. 4: Merozoiten. 5: Freier Merozoit. 6: Makrogametozyt. 7: Makrogamet. 8: Ruhestadium in intraepithelialen Lymphozyten. 9: Mikrogametozyt. 10: Mikrogameten. 11: Zygote. 12: intrazellulärer Sporont. 13: Ausgeschiedener Sporont innerhalb der Oozyste. 14: Sporoblasten innerhalb der Oozyste. 15: Oozyste mit Sporozysten, die Sporozoiten enthalten (Lucius und Loos-Frank, 97).

## 1.2 Bedeutung und Pathologie der Eimeriosen

Eimeriosen oder Kokzidiosen sind Infektionen, die von Parasiten der Gattung *Eimeria* verursacht werden. Sie rufen zum Teil schwere und komplexe Erkrankungen hervor, die aber stark von dem jeweiligen Erreger abhängen (Long, 93). Der Krankheitsverlauf ist abhängig von der Infektionsdosis und der Pathogenität des Erregers. Zusätzlich spielt der genetische Hintergrund des Wirtes eine Rolle. Von wirtschaftlicher Bedeutung sind hauptsächlich die Geflügel- und Rinderkokzidiosen. Beim Geflügel führt die sogenannte Kükenruhr zu großen wirtschaftlichen Ausfällen und erfordert intensive Bekämpfung durch den Dauereinsatz von Kokzidiostatika. Die beim Huhn vorkommenden sieben Eimerienarten sind in spezifischen Darmabschnitten lokalisiert und rufen in ihrem Krankheitsverlauf unterschiedliche Kokzidiosen hervor (Long, 93). *E. tenella* ist hochpathogen und vor allem bei Küken, Jung- und Legehennen von großer Bedeutung. Typischerweise ruft eine *E. tenella*-Infektion starke Entzündungsreaktionen und Durchfälle hervor, die je nach Infektionsdosis zu einem hohen Gewichts- und Blutverlust und sogar zum Tod führen können. In engem Zusammenhang zur Pathogenität steht die zweite Schizogonie, die im subepithelialen Gewebe stattfindet. Sie führt zur Zerstörung der Epithelzellen und des darunter liegenden Gewebes, einschließlich der Blutkapillaren. In gemischtaltrigen Tiergruppen stellt sich ein enzootisches Gleichgewicht ein, bei dem Jungtiere durch moderate natürliche Infektionen einen belastbaren Immunschutz gegen Reinfektionen aufbauen, so dass hier die Kokzidiose keine schwerwiegenden Probleme darstellt. Schwere Krankheitsverläufe und hohe Tierverluste beobachtet man fast ausschließlich in großen Gruppen, in denen gleichaltrige Tiere auf engstem Raum zusammenleben.

## 1.3 Schützende Immunantwort während Eimerieninfektionen

Eimerieninfektionen rufen eine starke Immunreaktion des Wirtes hervor (Ovington et al., 95). Dabei unterliegen primäre Infektionen einer starken immunologischen Kontrolle und induzieren eine stabile Immunität gegen nachfolgende Infektionen (Allen und Fetterer, 02; Long, 93). Die Mechanismen der Immunantwort und ihrer Effektoren sind nicht bekannt. Da aber Eimerien überwiegend Zellen des Darmtraktes parasitieren, ist davon auszugehen, dass insbesondere die mukosale

Immunantwort des *gut associated lymphoid tissue* (GALT) involviert ist (McDonald, 99; Yun et al., 00). Detaillierte Arbeiten zur Beurteilung der Immunreaktion wurden vorrangig im Mausmodell und eingeschränkt im Huhn durchgeführt.

T-Zellen vermitteln Immunkompetenz bei primären Infektionen und sind wesentlich an der Ausbildung der Immunität gegen Reinfektionen beteiligt, wie frühe Studien an athymischen Nagern und Zell-Transfereperimente zeigen konnten (Rose und Hesketh, 79; Rose et al., 88b; Rose et al., 88a).

### 1.3.1 Immunantwort nach Primärinfektionen

Ein kompetentes Wirtsimmunsystem kann die Parasitenreproduktion bei Erstinfektionen mit Eimerien limitieren. Hierbei spielen T-Zellen eine entscheidende Rolle, die durch Zellen des natürlichen Immunsystems unterstützt werden.

Da die adaptive Immunantwort erst verzögert eingreifen kann, werden vor allem die späten intrazellulären Stadien der Gamogonie erfasst und degradiert (Rose und Millard, 85). Genauere Analysen zur T-Zellantwort an genetisch veränderten Mäusen zeigten, dass dabei  $\alpha\beta^+$ -T-Zellen (Typ1) entscheidend beteiligt sind (Smith und Hayday, 98). Die Hauptmediatoren bei Mäusen sind  $CD4^+$ -T-Zellen, die durch die weniger relevanten  $CD8^+$ -T-Zellen unterstützt werden (Rose et al., 92). In diesem Zusammenhang ist die Situation im Huhn differenzierter zu betrachten. T-Zell-Depletionsstudien zeigten, dass bei *E. tenella*-Infektionen vor allem  $CD4^+$ -T-Zellen mitwirken. Hingegen bleiben Erstinfektionen mit *E. acervulina* durch  $CD4^+$ -T-Zell-Depletion unverändert (Trout und Lillehoj, 96). Demgegenüber führt die Depletion von  $CD8^+$ -Zellen bei *E. tenella* und *E. acervulina* zu einer Verminderung der Oozystenausscheidung (Lillehoj und Trout, 94). Im Vergleich zu Blutlymphozyten dominieren innerhalb der IEL des Darmepithels die  $CD8^+$ -T-Zellen, wovon ein Großteil  $\gamma\delta$ -T-Zellrezeptoren tragen. Die Bedeutung der  $\gamma\delta^+$ -T-Zellen bei Eimerieninfektionen liegt vermutlich in der Regulation einer überschießenden Immunreaktion, wie in Studien mit  $\gamma\delta$ -knockout-Mäusen gezeigt werden konnte (Lillehoj und Trout, 94; Roberts et al., 96; Smith und Hayday, 00a).

Der Schlüsselfaktor zur Kontrolle von Erstinfektionen ist Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (Lowenthal et al., 97). Die Wirkung von IFN- $\gamma$  führt zur Limitierung der Parasitenreplikation und trägt zur Verringerung der Pathologie bei, wie Studien mit Mäusen und Hühnern ergaben (Lillehoj und Choi, 98; Rose et al., 91b). IFN- $\gamma$  kommt

hier vermutlich eine duale Funktion zu, einmal wirkt es als antimikrobielles Agens und zum anderen aktiviert es das Immunsystem, das dann den Erstkontakt mit Eimerien kontrolliert. *In vitro*-Studien zeigten, dass IFN- $\gamma$  inhibierende Wirkung auf intrazelluläre Sporozoitien und deren Replikation ausübt. Dabei, so wird angenommen, nimmt IFN- $\gamma$  über einen rezeptorvermittelten Vorgang Einfluss auf das intrazelluläre Milieu und hemmt so die intrazelluläre Parasitenentwicklung (Heriveau et al., 00; Rose et al., 91a). Der IFN- $\gamma$ -vermittelte Immunmechanismus ist zumindest teilweise abhängig von Interleukin-12 (IL-12), wie Studien mit IL-12-defizienten Mäusen zeigten (Lillehoj, 98). Sekretiert wird IFN- $\gamma$  nicht nur durch aktivierte T-Zellen des adaptiven Immunsystems, sondern in der frühen Phase der Infektion auch durch Zellen der natürlichen Immunantwort. Beispielsweise werden größere Mengen IFN- $\gamma$  durch Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) freigesetzt (Schito und Barta, 97). Hinsichtlich der Eimerieninfektionen sind NK-Zellen auch deshalb von Bedeutung, weil sie einen großen Teil der intestinalen IEL ausmachen (Gobel et al., 01). Jedoch konnte bisher noch kein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Wirkung von NK-Zellen und der Parasitenlimitierung bei Eimerieninfektionen hergestellt werden (Rose et al., 95; Smith et al., 94), so dass dies noch genauer untersucht werden muss.

Die Rolle des angeborenen Immunsystems bei Primärinfektionen besteht neben der IFN- $\gamma$ -Sekretion durch NK-Zellen auch in der Immunregulation und Antigenpräsentation (Rose, 96). In diesem Zusammenhang spielen professionell antigenpräsentierende-Zellen (APZ) wie Makrophagen und dendritische Zellen (DZ) eine wichtige Rolle. Beispielsweise konnte an genetisch veränderten Mäusen gezeigt werden, dass die Antigenpräsentation von APZ über MHCII entscheidend zur Kontrolle einer Primärinfektion beiträgt (Smith und Hayday, 98). Wie NK-Zellen scheinen auch Makrophagen und DZ nicht in die direkte Parasiteneliminierung involviert zu sein. Es gibt zum Beispiel keine eindeutigen Hinweise darauf, dass reaktive Sauerstoff- oder Stickstoffprodukte, die von aktivierten Makrophagen erzeugt werden, Einfluss auf infizierte Zellen ausüben (Ovington et al., 95). Jedoch wird vermutet, dass Makrophagen an der Eliminierung von wirtsfremden Sporozoitien beteiligt sind. Eine weitere Aufgabe der Makrophagen besteht darin, die adaptive Immunantwort durch Antigenpräsentation, Zytokinsekretion und Zellaktivierung zu vermitteln und zu unterstützen. Die Funktion von DZ in Bezug auf Eimerieninfektionen ist noch unbekannt, jedoch führen sie bei anderen parasitischen Erkrankungen wie Toxoplasmose und Leishmaniose wichtige immunregulatorische

Prozesse aus (Scott und Hunter, 02). Hierzu zählt die IL-12-Produktion, die eine kritische Rolle in der Ausbildung einer protektiven TH1-Antwort einnimmt. Analog kann eine ähnliche Funktion der DZ bei Eimerieninfektionen vermutet werden.

### 1.3.2 Immunantwort nach Reinfektionen

Reinfektionen mit homologen Eimerien werden in der Regel vom Wirtsimmunsystem wirkungsvoll kontrolliert. Je nach Wirt und Parasitenart beobachtet man eine vollständige Immunität oder zumindest eine drastische Inhibition der Parasitenreplikation. Die Eliminierung wird über T-Zellen des adaptiven Immunsystems vermittelt (Lillehoj, 98). Allerdings sind die genauen Mechanismen, die einen Immunschutz gegen Eimerien aufbauen, weniger klar als die immunologischen Kontrollmechanismen bei einer Primärinfektion (Smith und Hayday, 00b). Anhand der zur Zeit vorliegenden Studien wird davon ausgegangen, dass vorwiegend CD8<sup>+</sup>-T-Zellen als Effektor-Gedächtniszellen agieren und den Immunschutz gegen Belastungsinfektionen mit Eimerien vermitteln (Rose et al., 92; Trout und Lillehoj, 96). Genauere Analysen mit genetisch manipulierten Mäusen ergaben, dass  $\alpha\beta^+$ -T-Zellen für die Ausbildung einer stabilen Immunität essentiell sind (Smith und Hayday, 00b). Auch in Hühnern steigt die lokale und periphere Anzahl von  $\alpha\beta^+$ -CD8<sup>+</sup>-Zellen kurz nach einer Reinfektion stark an (Breed et al., 96; Lillehoj, 94).

Als gesichert gilt, dass IFN- $\gamma$  für die Ausbildung eines Immunschutzes weder in der Maus noch im Huhn von großer Bedeutung ist, sondern hauptsächlich die Parasiteneliminierung während einer Primärinfektion unterstützt (Smith und Hayday, 00b). Auch die in der Darmmukosa dominierenden  $\gamma\delta^+$ -T-Zellen scheinen bei der Ausbildung der Immunität gegen Reinfektionen keine Rolle zu spielen (Roberts et al., 96). Die Art der Antigenpräsentation, welche die Protektion gegen Reinfektionen vermittelt, ist ebenfalls nicht aufgeklärt. Untersuchungen mit MHCI-, MHCII- oder CD1-defizienten Mäusen zeigten, dass jeweils ein adäquater Immunschutz gegen *E. vermiciformis* aufgebaut wurde (Smith und Hayday, 98; Smith und Hayday, 00b).

Obwohl die humorale Antwort nur einen geringen Einfluss auf die Ausbildung der Immunität besitzt, spielen Antikörper möglicherweise eine unterstützende Rolle. Beim Huhn ist sie für die Übertragung eines gewissen Schutzes über maternale Antikörper verantwortlich (Rose, 96).

Wie die effektive Parasiteneliminierung bei einer Reinfektion mit Eimerien stattfindet, ist nicht geklärt. Angriffspunkt sind jedoch vor allem die frühen invasiven Stadien (Rose, 96). Viele intra- und extrazelluläre Parasiten, die erfolgreich die Darmkrypten erreichen, sind in Hühnern nach einer Sekundärinfektion desintegriert. Außerdem findet man intrazellulär geschädigte Parasiten in intakten Wirtszellen (Rose und Hesketh, 87).

Die bisherigen Erkenntnisse legen den Schluss nahe, dass ein Zusammenspiel noch nicht verstandener und komplexer Mechanismen für die Ausbildung von immunprotektiven  $\alpha\beta^+$ -T-Zellen verantwortlich ist (Smith und Hayday, 98). Vorstellbar ist, dass diese Zellen bei einer Reinfektion über direkten Zellkontakt Veränderungen des intrazellulären Milieus von Wirtszellen induzieren und so die Eimerieninfektionen limitieren. Möglicherweise sind hierfür reaktive Sauerstoff- oder Stickstoffprodukte in den Wirtszellen verantwortlich. Vermutlich ist bei diesen Mechanismen die Antigenpräsentation der infizierten Wirtszelle von entscheidender Bedeutung.

## **1.4 Kontrolle der Kokzidiose**

### **1.4.1 Therapeutika**

Weltweit werden in der Geflügelindustrie die Eimerieninfektionen durch den Dauereinsatz von Antibiotika kontrolliert, deren Kosten auf etwa 800 Millionen US\$ jährlich geschätzt werden (Williams, 98). Man unterscheidet zwei Gruppen von Antikokzidien (Allen und Fetterer, 02). Zum einen die chemischen Wirkstoffe, die spezifisch in den parasitischen Stoffwechsel eingreifen. Beispielsweise werden strukturanaloge Substanzen von Vitaminen, wie Amprolium und Sulfonamide, eingesetzt. Zum anderen die Ionophoren, die über generelles Eingreifen in den Ionentransport das osmotische Gleichgewicht stören. Sie führen zum Einstrom von Kationen in die Zelle und somit zum Zusammenbruch des transmembranen Ionengradienten. Die Konsequenz des weltweiten, intensiven Einsatzes dieser Medikamente über die letzten Jahrzehnte ist eine stetig zunehmende Resistenzentwicklung (Chapman und Hacker, 94; Chapman, 98). Diese ist unabhängig von der Wirkstoffgruppe und bedingt eine ständige und sehr kostenintensive Neu- und Weiterentwicklung von Kokzidiostatika (Chapman, 98).

### 1.4.2 Impfstoffe und Impfstoffentwicklung gegen Eimerieninfektionen

Immunologische Interventionen stellen eine Alternative zur medikamentösen Kontrolle von Eimerieninfektionen dar (Rose, 96). Es existieren bereits sehr gut wirksame Lebendimpfstoffe auf der Basis attenuierter Parasiten (Paracox, Livacox) oder virulenter Erreger (Coccivac, Immucox) (Chapman et al., 02). Die Tatsache, dass unter natürlichen Bedingungen keine Kreuzimmunität beobachtet wird (Prowse, 91), erschwert die Impfstoffentwicklung erheblich, weshalb kommerzielle Vakzine eine Mischung verschiedener Eimerienarten enthalten. Da bisher keine ausreichende Vermehrung von Eimerien *in vitro* möglich ist, müssen die Oozysten im Huhn oder mittels *in ovo*-Kultivierung gewonnen werden. Insgesamt führt dies dazu, dass die verfügbaren Impfstoffe teuer sind und deshalb fast ausschließlich in der Aufzucht von Elterntieren und bei Legehennen eingesetzt werden. Darüber hinaus kann auch eine Kontamination der Umwelt mit lebenden Erregern nicht ausgeschlossen werden.

Alternativ zu den Lebendimpfstoffen wird versucht, eine Vakzine auf der Basis von rekombinanten Antigenen zu entwickeln. Eine Vielzahl verschiedener Proteine von diversen Parasitenstadien wurden in den letzten Jahren identifiziert und teilweise in Immunisierungsstudien eingesetzt (Jenkins, 98; Vermeulen et al., 01). Es konnte jedoch lediglich ein partieller Schutz gegen Belastungsinfektionen beobachtet werden, der nicht an das protektive Potential bereits erhältlicher Impfstoffe heranreicht. Vermutlich sind dafür zwei Gründe verantwortlich: (1) Die Wahl einer ineffizienten Applikationsform, die eine spezifische mukosale Immunantwort nur unzureichend anspricht, und/oder (2) die Wahl nichtprotektiver Antigene.

Um einen adäquaten Immunschutz zu induzieren, reicht das Vorliegen von invasiven und noch stoffwechselaktiven Sporozoiten aus. Das geht aus Untersuchungen mit strahlungsattenuierten Eimerien hervor, die auch ohne den vollständigen Entwicklungszyklus zu durchlaufen, eine stabile Immunität gegen Belastungsinfektionen vermitteln (Jenkins et al., 91b; Jenkins et al., 91a; Jenkins et al., 93). Von großem Interesse für die Impfstoffentwicklung sind deshalb Antigene von frühen Entwicklungsstadien, die direkt mit den Wirtszellen interagieren und für die Invasion und Etablierung der Parasiten in der Wirtszelle verantwortlich sind. Dazu gehören Organellen- und Oberflächenproteine, welche die Zellerkennung vermitteln und die Invasionsmaschinerie antreiben. Außerdem spielen sekretierte Komponenten eine wichtige Rolle, die über die parasitophore Vakuole der intrazellulär etablierten



Stadien mit den Wirtszellen in Kontakt kommen. Vermutlich werden Epitope dieser Antigene über MHC-I-Moleküle auf der Oberfläche von infizierten Wirtszellen präsentiert und tragen so zur Induktion der Immunprotektion bei, wie dies bei Plasmodien diskutiert wird (Morrot und Zavala, 04).

Die Lebensweise der Eimerien ruft, wie bei den meisten intrazellulär vorkommenden Krankheitserregern, eine zelluläre Immunantwort hervor, die für die Ausbildung des Immunschutzes essentiell ist. Um der natürlichen Immunität nahe zu kommen, sollten Impfstoffe diesen Arm der Immunantwort (TH1 und/oder CD8<sup>+</sup>-T-Zellreaktion) induzieren. Hierzu wurden in den vergangenen Jahren neue Impfstoffkonzepte entwickelt (Seder und Hill, 00).

Eine der vielversprechendsten neuen Immunisierungsformen ist die DNA-Vakzinierung, für die im Zusammenhang mit Eimerieninfektionen zwei Hauptargumente sprechen: (1) Sie induziert eine breit gefächerte Immunantwort, welche die CD4<sup>+</sup>- und die CD8<sup>+</sup>-T-Zellantwort, sowie die Antikörperantwort einschließt (Seder und Hill, 00). (2) DNA-Impfstoffe sind relativ einfach herzustellen. Aufgrund der großen Anzahl potentieller Kandidatenantigene, die bei komplexen Eukaryoten wie Eimerien getestet werden können, ist dies besonders von Vorteil. Die DNA-Vakzinierung beruht auf der Beobachtung, dass die direkte intramuskuläre Injektion von eukaryotischen Expressionsplasmiden zur Expression des Fremdproteins führt, und dass eine antigenspezifische, schützende Immunantwort generiert wird (Fynan et al., 93; Tang et al., 92; Wolff et al., 90). Die Expression des Proteins in den Körperzellen führt zum direkten Zugang zum MHC-I-Präsentationsweg und somit zur Induktion einer starken CD8<sup>+</sup>-T-Zellantwort. Aufgrund der Freisetzung von Fremdprotein aus den transfizierten Zellen können Antikörperantworten und weitere T-Helferzellantworten generiert werden, welche die Immunreaktion vervollständigen. Zur Kontrolle vieler Krankheitserreger, wie auch für Eimerien, ist die Induktion einer mukosalen Immunreaktion bedeutend. Hierzu gibt es Versuche, die nackte DNA intranasal bzw. oral zu applizieren oder mit Hilfe von Trägersubstanzen/Organismen an den gewünschten Ort zu platzieren. Vorstellbar sind Mikropartikel aus Chitosan oder Liposome, die als Träger für Proteine oder Plasmid-DNA dienen können (van der Lubben et al., 01). Des Weiteren können attenuierte Endobakterien (wie *Salmonella* oder *Listeria*) heterologe Antigene exprimieren oder als Vehikel für den Transport von Plasmid-DNA dienen (Gentschev et al., 00; Pogonka et al., 03). Eine weitere Variante der DNA-Immunisierung ist der Einsatz attenuierter viraler Vektoren

(meist Pockenvirus), welche die Information für das Fremdanigen tragen.

Erste Ansätze zur DNA-Vakzinierung gegen Eimerieninfektionen wurden bereits publiziert, erbrachten jedoch lediglich Teilreduktionen der Parasitenlast nach Belastungsinfektionen (Lillehoj et al., 00). Auch bakterielle (Vermeulen, 98) und virale Vektoren (Binger et al., 93) konnten bei Eimerieninfektionen bestenfalls unvollständigen Schutz induzieren. Obwohl bisher vielseitige Expressionssysteme und Applikationsformen verwendet wurden, bietet sich zur Zeit kein einheitliches Bild über das effizienteste Immunisierungsschema. Alle erwähnten Applikationsformen befinden sich zur Zeit in der Erprobungsphase und müssen weiter analysiert werden.

## **1.5 Ziele der Arbeit**

In der vorliegenden Arbeit sollten neue sekretorische Antigene von *E. tenella* identifiziert und auf ihr protektives Potential hin untersucht werden. Die Arbeiten sollten die Etablierung eines geeigneten DNA-Immunisierungsprotokolls beinhalten, mit dem der Immunisierungserfolg und Immunschutz analysiert werden kann. In vergleichenden DNA-Immunisierungsstudien sollte deshalb die Verwendung von zwei unterschiedlichen Vektoren und der Einsatz eines stabilisierenden, heterologen Fusionspartners getestet werden. Die zeitliche Analyse des Immunisierungserfolgs sollte anhand der Serokonversion mittels ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) überprüft werden.

Die Identifizierung neuer sekretorischer Proteine aus *E. tenella* sollte in zwei unterschiedlichen Ansätzen erfolgen. Einmal über die bioinformatische Analyse von *E. tenella*-EST-Datenbanken, die zur Identifizierung von sekretierten *E. tenella*-homologen Proteinen führen sollte. Zum anderen sollten mit Hilfe eines Komplementations-Systems in Hefe (Jacobs et al., 97; Klein et al., 96), aus einer zu konstruierenden *E. tenella* Sporozoiten-cDNA-Bank sekretorische Proteine identifiziert werden. Aus dem Pool identifizierter Proteine sollten ausgewählte Sequenzen in einen DNA-Vakzinierungsvektor kloniert und mit dem erstellten Immunisierungsschema getestet werden.

## 2 Ergebnisse

### 2.1 Identifizierung sekretorischer Proteine von *E. tenella*

Das Fehlschlagen bisheriger Impfstoffprojekte gegen *E. tenella* könnte neben weiteren Ursachen dadurch bedingt sein, dass nicht die richtigen Antigene identifiziert wurden. Deshalb sollten in der vorliegenden Arbeit neue Antigene identifiziert werden, die möglicherweise einen ausreichenden Schutz induzieren können. Von immunologischen Interesse sind dabei vor allem Parasitenmoleküle, die an einer direkten Wirts-Parasit-Interaktion beteiligt sind und dadurch mit dem Wirtsimmunsystem interagieren. Hierzu zählen insbesondere Oberflächenproteine oder Moleküle die sekretiert werden. Diese können dann in die parasitophore Vakuole gelangen und letztendlich über MHC-I auf der Oberfläche der Wirtszellen präsentiert werden. Aus diesem Grund wurde die Suche nach neuen *E. tenella*-Antigenen in der vorliegenden Arbeit auf diese Molekülgruppe fokussiert und es wurden zwei verschiedene Methoden zur Identifizierung durchgeführt: (1) Die Identifizierung durch *in silico*-Analysen von EST-Datenbanken von *E. tenella*. (2) Die Identifizierung von Proteinen mit N-terminalem Signalpeptid aus einer *E. tenella*-cDNA-Bank durch funktionelle Komplementierung in transfizierten Hefezellen.

#### 2.1.1 Identifizierung sekretierter Proteine mittels bioinformatischer Methoden

Die EST-Datenbanken von *E. tenella* enthielten zum Zeitpunkt der Analysen (März 2003) 12187 Einträge und umfassten cDNA-Sequenzen, die sowohl aus Sporozoiten als auch aus Merozoiten stammten. Wie in Abbildung 2 schematisch dargestellt, erfolgte die Computeranalyse ("DNASignalP") in drei Schritten: (1) Die *E. tenella*-EST-Sequenzen wurden mit dem Computerprogramm SeqMan® (DNASTAR, USA) zu sogenannten Contigs zusammengefasst. Aus 12187 EST-Sequenzen ergaben sich 2881 Contigs. Mit diesem Verfahren werden redundante EST eines mRNA-Transkriptes identifiziert und zu einer Sequenz zusammengefasst, die als Contig bezeichnet wird. (2) Diese Transkripte (Contigs) wurden mit Hilfe des blastx-Algorithmus (Altschul et al., 97) mit einer Proteindatenbank verglichen. (3) Die Sequenzen mit der größten Übereinstimmung wurden jeweils auf den Besitz einer

Signalsequenz hin überprüft. Dazu wurde der N-Terminus mit dem SignalP-Algorithmus (Nielsen et al., 97) analysiert. Um sicher zu stellen, dass die anschließenden Resultate auf die Eimeriensequenzen übertragbar waren, wurden nur die homologen Sequenzen zur Analyse herangezogen, die einen blastx *E-value* kleiner  $10^{-4}$  besaßen. Dieser Wert stellt einen Grad der Homologie zwischen zwei Proteinsequenzen dar, wobei die Wahrscheinlichkeit mit abnehmenden *E-value* zunimmt (Selzer et al., 04). Insgesamt wurden mit dieser Methode 84 Proteinsequenzen identifiziert, die eine Vorhersage für eine Signalsequenz zeigten. Die bioinformatischen Arbeiten wurden von R. Marhöfer und P. Selzer (Intervet Innovation GmbH, Schwabenheim) durchgeführt.

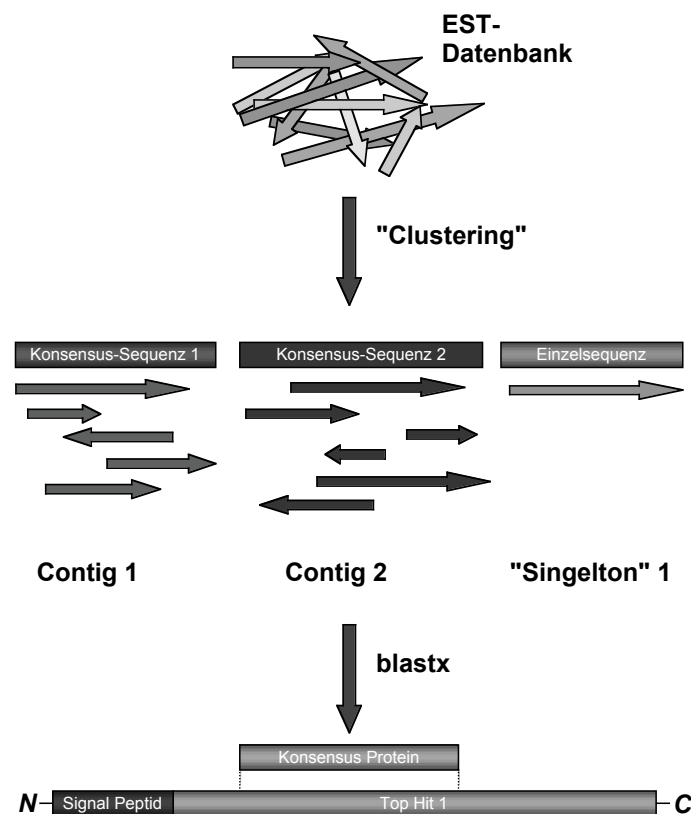


Abb. 2: Die DNASignalP-Analyse zur Identifizierung sekretorischer Proteine aus EST-Datenbanken (Selzer et al., 04).

Eine erste Analyse zeigte, dass 51 Contigs Homologien zu bekannten Proteinen verwandter Apikomplexa-Parasiten besaßen. Die verbleibenden Contigs umfassten Proteinhomologe von phylogenetisch weiter entfernten Organismen. Abgeleitete Proteine von 54 Contigs sind aufgrund ihrer beschriebenen Funktion oder Lokalisierung (sekretiert oder an der Oberfläche) möglicherweise an der Wirts-

Parasit-Interaktion beteiligt und werden deshalb im nachfolgenden näher beschrieben. Die übrigen abgeleiteten Proteinsequenzen, die Homologien zu 17 Mitochondrienproteinen und zu acht ER/Golgi-Proteinen zeigten, sowie fünf Proteine ohne funktionelle Zuordnung, wurden in den weiteren Analysen nicht berücksichtigt.

#### 2.1.1.1 Apikomplexaspezifische, sekretorische Proteine

Eukaryotische Proteine, die zur Sekretion bestimmt sind, werden zunächst in das Endoplasmatische Retikulum (ER) transportiert. Der weitere Transport in die verschiedenen Kompartimente oder an die Zelloberfläche erfolgt über Vesikel. Neben den für eukaryotische Zellen typischen Kompartimenten besitzen Apikomplexa-Parasiten zusätzlich sekretorische Organellen, die ebenfalls Ziele des Vesikeltransportes sind (Joiner und Roos, 02). Diese Organellen sind Teile des sogenannten Apikalkomplex und bestehen aus Mikronemen, Rhoptrien und "Dichten Granula". Proteine dieser Organellen ermöglichen essentielle Prozesse wie Zellinvasion und die für Apikomplexa einzigartige Bewegungsart der *gliding motility* (Opitz und Soldati, 02).

Durch die EST-Analyse konnten homologe Sequenzen zu AMA1 (Hehl et al., 00; Kocken et al., 00) und SPATR (Kappe et al., 01) identifiziert werden (Tab. 1). Es handelt sich hierbei um Moleküle, die an der initialen Parasit-Wirtszell-Bindung, dem ersten Schritt der Zellinvasion, beteiligt sind. Neben der Zellerkennung stellt die spezifische *gliding motility* einen weiteren essentiellen Schritt invadierender Apikomplexa dar. An diesem komplexen Prozess sind unter anderem Mikronemenproteine beteiligt (Opitz und Soldati, 02). Diese werden in Form eines Vorläuferproteins in den Mikronemen gespeichert und signalvermittelt als prozessiertes Protein sezerniert. Es konnten die Eimerienproteine EtMIC1,-2,-4 (Tomley et al., 91; Tomley et al., 96; Tomley et al., 01) und EtMIC-5 (Brown et al., 00) identifiziert werden, sowie zwei Contigs, deren abgeleitete Aminosäuresequenzen Homologien zu den *T. gondii*-Proteinen TgMIC8 und -10 (Hoff et al., 01; Meissner et al., 02) zeigten.

Das Protein Ea3-1E von *E. acervulina* und ein nicht näher charakterisiertes Oberflächenmolekül von *P. falciparum* sind ebenfalls auf der Oberfläche lokalisiert (Lillehoj et al., 00). Daneben wurden in der Analyse die Eimerienproteine SO7 und

EtA1 (Kramer et al., 93; Profous-Juchelka et al., 88) identifiziert; diese sind in den refraktilen Körperchen lokalisiert, welche eimerienspezifische Organellen darstellen.

Tab 1: *Eimeria tenella*-Sequenzen mit Homologien zu apikomplexaspezifischen, sekretorischen Proteinen.

Protein	Funktion	Accession number (EMBL)	Contig-Nummer
<i>Plasmodium</i> ssp., <i>T. gondii</i> "AMA 1" (Hehl et al., 00; Kocken et al., 00)	Adhäsion, Mikronemen und Oberfläche	Q9N9E4, O15681	90, 158; 1016
<i>P. yoelii</i> "SPATR" (Kappe et al., 01)	Thrombospondin-ähnlich, Adhäsionsligand, Oberfläche	Q963C1	2007
<i>E. tenella</i> "EtMIC1" (Tomley et al., 91)	Adhäsion und Bewegung, Mikronemen und Oberfläche	O43981	81; 88
<i>E. tenella</i> "EtMIC2" (Tomley et al., 96)	Adhäsion und Bewegung, Mikronemen und Oberfläche	Q24936	35; 1776
<i>E. tenella</i> "EtMIC4" (Tomley et al., 01)	Adhäsion und Bewegung, Mikronemen und Oberfläche	Q9BI05	2223
<i>E. tenella</i> "EtMIC5" (Brown et al., 00)	Adhäsion, Mikronemen und Oberfläche	Q9U966	124, 564
<i>T. gondii</i> "TgMIC8" (Meissner et al., 02)	Transmembran-Protein, Mikronemen und Oberfläche	Q9BIM7	1674
<i>T. gondii</i> "TgMIC10" (Hoff et al., 01)	Transmembran-Protein, Mikronemen und Oberfläche	Q9GSV5	2078
<i>E. tenella</i> "SO7" (Profous-Juchelka et al., 88)	Refraktile Körperchen, Sporozoiten	P15744	33
<i>E. tenella</i> "EtA1" (Kramer et al., 93)	Nucleotid-Transhydrogenase, Refraktile Körperchen	Q07600	2547
<i>E. acervulina</i> "Ea3-1E" (Lillehoj et al., 00)	Oberfläche	Q9UA42	616
<i>P. falciparum</i> Oberflächenprotein	Membranprotein	Q9U0J9	2992

#### 2.1.1.2 Transporter-, Rezeptor- und Signalproteine

Verschiedene Kanäle und Transporter vermitteln die Nährstoffaufnahme und Ionen-Regulation über Membranen. Hierzu zählen die identifizierten Adenosin- und Biopterin-Transporter sowie der H<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Transporter (Tab. 2).

Proteinkinasen und Phosphatasen sind Schlüsselenzyme in vielen biochemischen Prozessen und spielen eine wesentliche Rolle in der zellulären Kommunikation und Regulation (Kappe et al., 99). Zu dieser Molekülgruppe gehören die gefundenen Histidin- und Tyrosin-Kinasen. Die gefundenen Proteine Lag1, Notch-like-Rezeptor

und das Synaptobrevin-ähnliche Molekül spielen ebenfalls eine Rolle in der transmembranen Signalvermittlung. Eine homologe Serin/Threonin-Phosphatase Typ1 von *T. gondii* ist bei der Regulation der Zellinvasion beteiligt (Delorme et al., 02), so dass auch dem homologen *E. tenella*-Protein eine ähnliche Funktion zukommen könnte. In der vorliegenden Analyse wurden ebenfalls drei unterschiedliche Phosphatidat-Phosphatasen (PAP) identifiziert, die vermutlich am Phosphoglycerid-Stoffwechsel beteiligt sind (Tab. 2).

Tab. 2: *Eimeria tenella*-Sequenzen mit Homologien zu Transportern und signalvermittelnden Proteinen.

Protein	Funktion	Accession number (EMBL)	Contig-Nummer
<i>T. gondii</i> "TGAT" (Chiang et al., 99)	Adenosin-Transporter, Membranprotein	Q9TVQ1	1763
<i>Synechocystis</i> ssp. "SLR0642"	Biopterin-Transporter-ähnlich, integrales Membranprotein	Q55721	1795
<i>Mus musculus</i> "PDE7A" (Bloom und Beavo, 96)	cAMP-Phosphodiesterase, Signaltransduktion	P70453	2934
<i>Homo sapiens</i> "ABCA2" (Kaminski et al., 01)	ATP-binding cassette, Transporter, integrales Membranprotein	Q9BZC7	461
<i>Anabaena</i> ssp. "AlI0626" (Kaneko et al., 01)	H <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> -Transporter, Regulation der Ca <sup>2+</sup> -Konzentration	Q8YZ61	2324
<i>Dictyostelium discoideum</i> "Synaptobrevin" (Glockner et al., 02)	Hypothetisches Synaptobrevin-ähnliches Transmembranprotein, Signalvermittlung	Q8T1W2	566
<i>Homo sapiens</i> "LAG1" (Lee, 91)	Longevity assurance homolog 1; integrales Membran-Signalprotein	P27544	2450
<i>D. melanogaster</i> "NOTCH" (Wharton et al., 85)	NOTCH-Rezeptor, Typ 1-Membranprotein, Signalprotein	P07207	2232
<i>D. melanogaster</i> "WUN" (Zhang et al., 97)	Phosphatidat-Phosphatasen Typ2, Typ2a und Typ 2b Transmembranprotein	Q9V576	77
<i>H. sapiens</i> "PPAP2B" (Kai et al., 96)		O14495	127
<i>M. musculus</i> "PPAP2A" (Kai et al., 97)		Q61469	2531
<i>Arabidopsis thaliana</i> "BSU1" (Mora-Garcia et al., 04)	Bri1 Suppressionsprotein 1, Serin/Threonin-Phosphatase	Q9LR78	507
<i>Caulobacter crescentus</i> "DIVJ" (Ohta et al., 92)	Histidin-Proteinkinase, Transmembranprotein, Signalvermittlung	Q03228	1161
<i>A. thaliana</i> "F14G6.1"	Zink-Finger-Protein ("RING"), Protein-Protein-Interaktion	Q9S783	2900

### 2.1.1.3 Sekretierte, enzymatisch aktive Moleküle und Matrixproteine

Proteolytische Prozessierungen von sekretierten Molekülen finden auch bei Apikomplexen während der Passage durch ER und Golgi oder an der Oberfläche statt (Ngo et al., 00). In diesem Zusammenhang ist es von Interesse, dass zwei Contigs Übereinstimmungen zu Proteasen zeigten (Tab. 3). Es wurden ein Pepsin-Homolog und eine Subtilisin-ähnliche Protease gefunden. Des Weiteren wurde eine homologe Sequenz zu Glutaredoxin von *Theileria parva* identifiziert, die als einziger Vertreter dieser Proteinfamilie eine Signalsequenz besitzt und sekretiert wird (Ebel et al., 97). Eine Sequenz zeigte Homologien zum Enzym Trehalase. Das Molekül spaltet den Zucker Trehalose und ist im Kohlenstoffwechsel involviert. Vermutlich spielt das Enzym auch eine Rolle in der Entgiftung von Radikalen. Zusätzlich wurde eine F-Spondin1-ähnliche Sequenz und ein Protein mit Homologien zu einem Prolin-reichen Zellwandmolekül identifiziert.

Tab. 3: Sekretorische Enzyme und Matrixbestandteile mit Homologien zu *Eimeria tenella*-Sequenzen.

Protein	Funktion	Accession number (EMBL)	Contig-Nummer
<i>Macaca fuscata</i> "Pepsin A2/A3" (Kageyama et al., 91)	Sekretierte-Protease	P27677	2051
<i>P. berghei</i> "SUB2"	Sekretierte Subtilisin-ähnliche Serinprotease	Q9NG20	376
<i>Theileria parva</i> "Glutaredoxin" (Ebel et al., 97)	Sekretiertes Glutaredoxin-ähnliches Protein	Q9BH70	2186
<i>Bombyx mori</i> "Trehalase" (Su et al., 93)	Sekretiert, Degradierung von Trehalose	P32358	414
<i>Brachydanio rerio</i> "SPON1A" (Higashijima et al., 97)	F-spondin1, extrazelluläres Matrixprotein	O42113	1740
<i>Sorgum vulgare</i> "Extensin" (Raz et al., 91)	Prolin-reiches Glycoprotein, Struktur von Zellwänden	Q9S436	2589



#### 2.1.1.4 Analyse und Charakterisierung von TA4-ähnlichen Sequenzen

Nach der Datenanalyse zeigten insgesamt 17 Contigs Übereinstimmungen zum TA4-Protein, dem Hauptoberflächenantigen von *E. tenella*-Sporozoiten (Brothers et al., 88; Files et al., 87). Eine detaillierte Analyse ergab, dass es sich insgesamt um 14 unterschiedliche Sequenzen handelte, die 30 % bis 60 % Sequenzhomologien aufwiesen. Hiervon entsprach eine Sequenz exakt dem TA4-Protein.

Mit Ausnahme von zwei Contigs, denen die Sequenzinformationen für die N-terminalen Bereiche fehlten, besaßen alle TA4-ähnlichen Moleküle nach dem SignalP-Algorithmus (Nielsen et al., 97) ein Signalpeptid. Aufgrund der Zusammensetzung der *E. tenella*-EST-Datenbank, die etwa zu gleichen Teilen aus Merozoiten- und Sporozoiten-cDNA besteht, konnte untersucht werden, ob die TA4-Moleküle stadienspezifische Unterschiede zeigten.

Tab. 4: Stadienspezifische EST-Verteilung der TA4-ähnlichen Contigs.

TA4-Contig	EST		blastx <i>E-value</i> zur TA4-Sequenz	<i>E. tenella</i> -SAG (Tabares et al., 04)
	Sporozoiten	Merozoiten		
Contig 145/538/2925	48	-	-	TA4/SAG1
Contig 2051/151	-	54	$10^{-6}/10^{-59}$	-
Contig 2219	-	10	$10^{-47}$	SAG4
Contig 1938	-	127	$10^{-39}$	SAG2
Contig 1244	-	30	$10^{-28}$	SAG3
Contig 2218	11	-	$10^{-26}$	-
Contig 2220	-	9	$10^{-23}$	-
Contig 1716	-	79	$10^{-17}$	SAG7
Contig 1829	-	37	$10^{-11}$	SAG5
Contig 331	-	21	$10^{-10}$	SAG11
Contig 180	-	39	$10^{-9}$	-
Contig 67	55	5	$10^{-9}$	-
Contig 1957	-	119	$10^{-9}$	-
Contig 142	15	3	$10^{-4}$	SAG10

Wie in Tabelle 4 dargestellt, wurden tatsächlich erhebliche Unterschiede in der Verteilung ihrer zugrunde liegenden EST-Sequenzen gefunden. So stammten beispielsweise EST-Sequenzen der originalen TA4-Sequenz ausschließlich aus Sporozoiten und Contig 1938 war nur aus Merozoiten-EST zusammengesetzt. Hiernach transkribieren Sporozoiten nur wenige und Merozoiten sehr viele TA4-Varianten.

Diese Resultate werden durch eine kürzlich publizierte Studie unterstützt (Tabares et al., 04). Dabei wurden 23 TA4-ähnliche Sequenzen näher untersucht und es konnte gezeigt werden, dass die Proteine auf der Oberfläche lokalisiert und mit einem GPI-Anker in der Membran befestigt sind. Aufgrund ihrer Lokalisierung wurden die Proteine in *surface antigens* (SAG1-23) umbenannt. Das Expressionsmuster der 23 SAG-Sequenzen ergab, entsprechend der bioinformatischen Analyse, dass nur wenige Sequenzen in Sporozoiten transkribiert werden (Tabares et al., 04). Bis auf das SAG1(=originale TA4-Protein) werden alle untersuchten SAG-Sequenzen in Merozoiten exprimiert (Tabares et al., 04). Von den 23 beschriebenen SAG (TA4)-Proteinen waren acht in der vorliegenden Studie wiederzufinden. In Tabelle 4 ist die entsprechende Zuordnung der Sequenzen dargestellt. Die Autoren gehen von etwa 250 unterschiedlichen SAG-Genen im *E. tenella*-Genom aus.

Ein multipler Abgleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen zeigte als wichtigstes Merkmal sechs konservierte Cysteine, die an der Bildung von Disulfidbrücken beteiligt sein können (Abb. 3). Neben den Cysteinen sind weitere Aminosäuren konserviert, welche über die gesamte Sequenz verteilt sind. Insbesondere die Aminosäureabfolge AVSFVALYNP (Bereich 170, Abb. 3) ist hoch konserviert, stellt aber wie die übrigen konservierten Bereiche kein bekanntes Proteinmotiv dar. Das originale TA4-Protein wird proteolytisch prozessiert, wobei ein Tripeptid (RRL) aus der Primärsequenz entfernt wird. Die beiden verbleibenden Peptide von 17 und 8 kDa werden über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden (Brothers et al., 88). Neben dem TA4-Protein zeigten noch weitere drei Sequenzen (contig 151, 1938, 1244) ein RRL-Motiv. Möglicherweise unterliegen auch diese Proteine proteolytischer Prozessierung und werden in ähnlicher Form modifiziert. Die übrigen Sequenzen besitzen kein konserviertes RRL-Motiv.



### 2.1.2 Identifizierung sekretierter Proteine durch experimentelle Methoden

Die Identifizierung von *E. tenella*-Proteinen mit N-terminalem Signalpeptid aus den Sporozoitenstadien wurde mit der sogenannten *signal sequence trap*-Methode in *Saccharomyces cerevisiae* durchgeführt (Jacobs et al., 97; Klein et al., 96). Das Verfahren nutzt die Tatsache aus, dass sekretierte Proteine von eukaryotischen Organismen eine N-terminale Konsensussequenz benötigen. Diese Signalsequenzen führen zur Translokation der Proteine in das ER. Sie sind funktionsspezifisch und erfüllen ihre Aufgabe auch über Organismuskategorien hinweg. Dies kann dazu genutzt werden, die Sekretion eines Proteins ohne N-terminale Konsensussequenz über eine fremde Signalsequenz zu vermitteln (Kaiser et al., 87). Für die Methode werden zwei Komponenten benötigt:

Die erste Komponente ist der Hefevektor pSUC2 (Abb. 4), der die genetische Information für das Enzym Invertase trägt, dem die Signalsequenz und das Start-ATG fehlt. Die Invertase steht unter Kontrolle des Alkoholdehydrogenase (ADH)-Promotors. Des Weiteren besitzt der Vektor einen Replikationsursprung und Selektionsmarker für Hefen und *E. coli*, so dass das Plasmid in beiden Systemen vermehrt werden kann und positive Transformanten selektiert werden können.

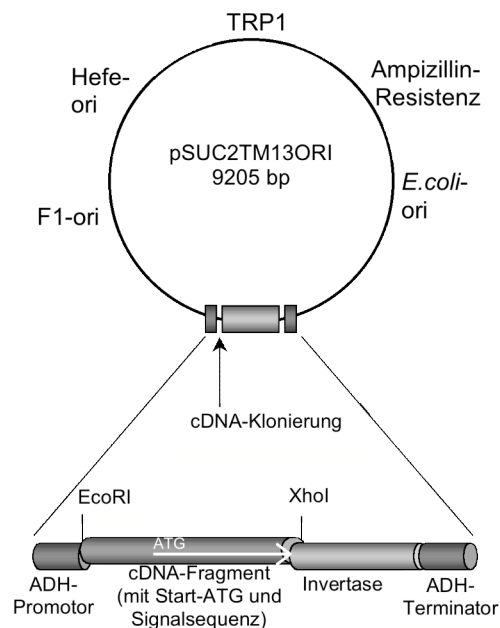


Abb. 4: Hefepiasmid pSUC2 (Jacobs et al., 97).

Die zweite Komponente ist die Invertase-defiziente Hefemutante YTK12 (*suc2<sup>-</sup>*). Die Sekretion von Invertase dient in Wildtyp-Hefen dazu, bei Abwesenheit von Glukose alternative Kohlenstoffquellen wie Saccharose oder Raffinose zu erschließen. Die Invertase-defiziente Hefemutante ist demnach im Gegensatz zu Wildtyp-Hefen nicht in der Lage, Saccharose als Kohlenstoffquelle zu nutzen und zeigt daher auf Minimalmedium mit Saccharose, aber ohne Glukose, kein Wachstum. Diese Defizienz kann über ein eingebrachtes Plasmid, das die vollständige Information für das Invertasegen besitzt, komplementiert werden (Abb. 5). Um fremde cDNA-Sequenzen zu analysieren, werden diese am 5'-Ende vor das modifizierte Invertasegen des pSUC2-Vektors, das keine Signalsequenz trägt, kloniert und anschließend in die Hefemutante YTK12 eingebracht. Dies führt zur Wiederherstellung des Wachstums auf den Minimalplatten, sofern der heterologe cDNA-Anteil für eine Signalsequenz kodiert, ein Start-ATG besitzt und im *open reading frame* (ORF) zum Invertasegen vorliegt (Abb. 4 und 5).

Methodisch lassen sich die durchgeführten Arbeiten demnach in drei Teile gliedern: (1) Die Konstruktion einer *E. tenella*-Sporoziten-cDNA-Plasmid-Bank in *E. coli*, (2) die Transfektion von Hefemutanten und (3) die Selektion der positiven Transfektanten auf Selektionsagarplatten.

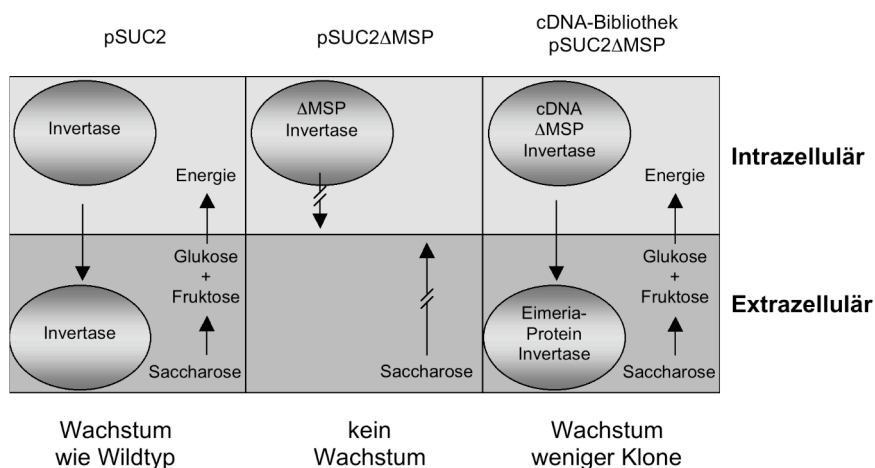


Abb. 5: Identifizierung von Proteinen mit N-terminalen Signalpeptiden durch funktionelle Komplementierung in *Saccharomyces cerevisiae*.

**pSUC2:** Die Expression der vollständigen Invertase über ein Hefepiasmid führt zur Sekretion des Proteins. Das Wachstum der Hefemutante YTK12 (Invertase-defizient) auf Saccharose-Minimalmedium zeigt dadurch Wildtypcharakter. **pSUC2ΔMSP:** Dem Invertasegen fehlt die Signalsequenz und es wird nicht sekretiert. Es findet deshalb kein Wachstum statt. **cDNA-pSUC2ΔMSP:** Nur Rekombinante mit heterologen Signalsequenzen zeigen Invertasesekretion. Positive Klone zeigen Wachstum auf Saccharose-Minimalmedium.

### 2.1.2.1 Konstruktion einer cDNA-Bank aus *E. tenella*-Sporozoiten

Um mittels der Hefeselektionsmethode sekretorische *E. tenella*-Proteine zu identifizieren, wurde zunächst eine cDNA-Plasmid-Bibliothek von *E. tenella*-Sporozoiten hergestellt. Hierzu war es notwendig, aus Oozysten hochreine Sporozoiten zu gewinnen, was durch die Anwendung eines Aufreinigungsverfahrens über eine DE-52 Anionen-Austauschchromatographie-Säule gewährleistet werden konnte (Schmatz et al., 84). Die Ausbeuten an Sporozoiten lagen dabei etwa im Verhältnis 1:1 zu den eingesetzten Oozysten. Da jede Oozyste acht Sporozoiten enthält, bedeutete dies einen Verlust an Sporozoitenmaterial.

Die Isolierung der mRNA durch Dynabeads® Oligo (dT)<sub>25</sub> (Dynal, Norwegen) hatte den Vorteil mRNA direkt aus Zelllysate oder Gesamt-RNA gewinnen zu können. Dementsprechend wurde die mRNA sowohl aus ca. 10<sup>9</sup> *E. tenella*-Sporozoiten direkt extrahiert, als auch aus ca. 100 µg Sporozoiten-Gesamt-RNA gewonnen. Die Bindungskapazität der pro Aufreinigung eingesetzten Matrix betrug ca. 2 µg mRNA, so dass theoretisch insgesamt 4 µg mRNA zu Verfügung standen. Da die Parasitengewinnung sehr aufwändig ist, wurden die mRNA-Fractionen zusammengeführt und ohne weitere Analyse für die Erststrang cDNA-Synthese eingesetzt.

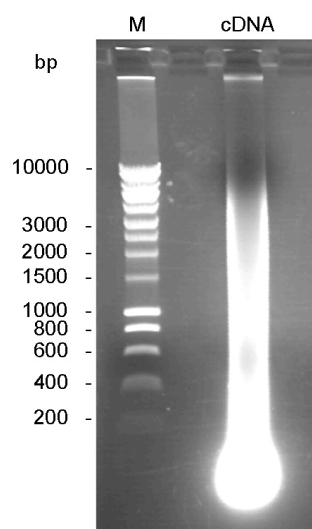


Abb. 6: Agarose-Gelelektrophorese der *Eimeria tenella*-Sporozoiten-cDNA.

*E. tenella*-Sporozoiten-cDNA nach EcoRI-Adapter-Ligation und XhoI-Restriktionsverdau im 0,8 %-igen Agarosegel aufgetrennt.

Der für die cDNA-Synthese verwendete Zufallsprimer erhöht im Gegensatz zum Polyadenosin (PolyA)-Primer die Wahrscheinlichkeit, mRNA im 5'-Bereich zu amplifizieren. Zusätzlich sollte durch die Einführung einer XhoI-Schnittstelle, ein gerichtetes Klonieren ermöglicht werden. Nach erfolgter Zweitstrangsynthese wurden EcoRI-Adaptoren an die cDNA-Enden ligiert. Im Anschluss fand ein XhoI-Restriktionsverdau statt und die cDNA konnte durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt werden (Abb. 6). Das Agarosegel zeigte einen konsistenten cDNA-Schmier zwischen 200 - 4000 Basenpaaren (bp) und zusätzlich ein sehr starkes Signal unter 200 bp. Vermutlich handelte es sich dabei um nicht-ligierte Adaptoren bzw. Adaptoren, die durch den XhoI-Verdau abgespalten wurden (Abb. 6).

Die Hefeselektionsmethode ist optimiert für kürzere DNA-Fragmente, welche vor das Invertasegen kloniert werden können. Somit wurden Fragmente von 200-800 bp aus dem präparativen Gel ausgeschnitten, elektroeluiert und durch Phenol/Chloroform-Extraktion gereinigt. Nachfolgend konnte die gewonnene cDNA in den vorbereiteten Klonierungsvektor pSUC2 ligiert werden. Die Transformation der cDNA-Bank in *E. coli*-XL1-blue Zellen resultierte in  $5 \times 10^5$  colony forming units (cfu) mit 92% rekombinanten Plasmiden. Eine Restriktionsanalyse mit EcoRI und XhoI von 38 zufällig ausgewählten Transformanden führte zur Freisetzung der Inserts die eine durchschnittliche Größe von 580 bp hatten (Abb. 7).

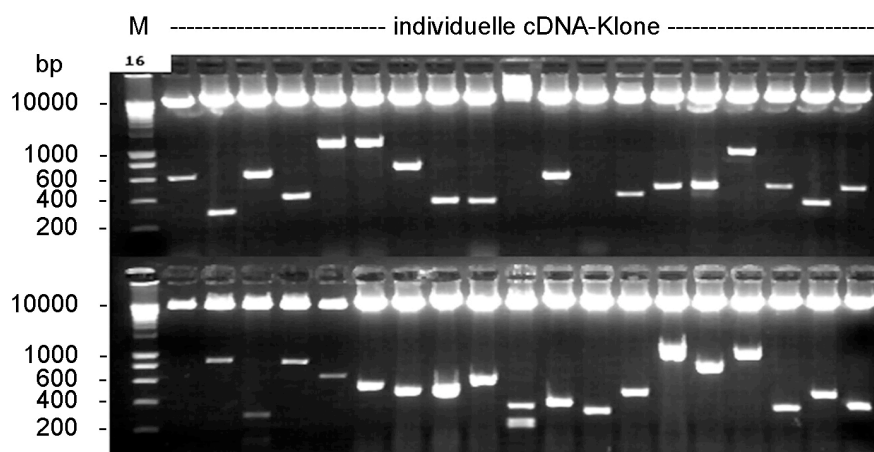


Abb. 7: Insertgröße zufällig ausgewählter Klone der *Eimeria tenella*-Sporozoiten-cDNA-Bank.

Doppelverdau mit EcoRI/XhoI. Plasmid-DNA von 38 zufällig ausgewählten Bakterienklonen im 0,6 %-igen Agarosegel. Vektorgöße (pSUC2) ca. 9200 bp. M: DNA-Marker

### 2.1.2.2 Identifizierung sekretorischer *E. tenella*-Sequenzen aus Hefetransfektanten durch funktionelle Komplementation

Zur Identifizierung von Signalsequenzen war es zunächst notwendig, Hefezellen mit der *E. tenella*-cDNA-Bank zu transfizieren. Die eingesetzte Hefemutante (Hefestamm YTK12, Genetics Institute, USA) zeichnet sich durch die schon beschriebene Deletion im Invertasegen (*suc2<sup>-</sup>*) aus. Zusätzlich ist sie nicht in der Lage, die Aminosäure Tryptophan zu synthetisieren (*trp1<sup>-</sup>*), so dass mit einem entsprechenden supplementierenden Plasmid positive Transfektanten selektioniert werden können. Die Transfektion mit der cDNA-Bank ergab  $2 \times 10^5$  TRP<sup>+</sup>-Hefezellen. Zur Identifizierung der Signalpeptide wurden die Hefen auf Replikaplatten mit Raffinose-Selektionsmedium übertragen. Um den Anteil an falsch-positiven Klonen zu minimieren, wurden die positiven Kolonien nochmals auf Raffinose-Selektionsagarplatten vereinzelt, wodurch schließlich 191 positive Hefeklone identifiziert werden konnten. Der Selektionsfaktor betrug demnach ca. 1000. In Abbildung 8 sind beispielhaft sechs rekombinante Hefeklone gezeigt, die, im Gegensatz zu den Kontrollen auf Selektionsagarplatten wachsen. Zusätzlich wurde die extrazelluläre Invertaseaktivität mit einer Farbreaktion nachgewiesen und somit die Sekretion des Enzyms bestätigt.

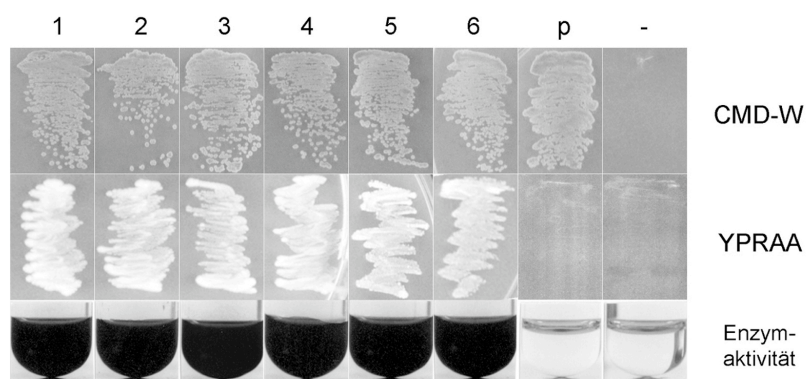


Abb. 8: Überprüfung der extrazellulären Invertaseaktivität rekombinanter Hefeklone.

1-6: Hefemutante YTK12 mit pSUC2-Plasmiden, die unterschiedliche *Eimeria tenella*-cDNA-Sequenzen tragen. p: Hefemutante mit Plasmid, jedoch ohne Insert. Negativkontrolle (-): Hefezellen ohne Plasmid. CMD-W: Minimalmedium ohne Tryptophan. YPRAA: Medium mit Raffinose, jedoch ohne Glukose. Enzymaktivität: Dunkler Farbumschlag zeigt extrazelluläre Invertaseaktivität.



Die cDNA-Sequenzen der 191 Klone wurden mittels DNA-Sequenzierung bestimmt und geeignete ORF mit Start-ATG ausgewählt. Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen wurden dann mit dem Programm SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) analysiert, das in der Lage ist, mit einer hohen Genauigkeit Signalpeptide und deren Schnittstelle vorauszusagen (Nielsen et al. 1997). Die Analyse prognostizierte für 162 Sequenzen (85 %) das Vorhandensein eines Signalpeptids. Ein anschließender Sequenzvergleich mit der Computersoftware MacVector (Pharmacopeia, USA) ergab, dass es sich dabei um insgesamt 25 unabhängige Sequenzen handelte (Tab. 5 und Tab. 6).

Tab. 5: Identifizierte Signalpeptide der *Eimeria tenella*-Sporozoiten cDNA's.

Klon	n	%	Signalsequenz	p
H2	29	15,2	<u>M</u> <u>V</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>R</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>F</u> <u>V</u> <u>V</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>H</u> <u>A</u> <u>Y</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>A</u> ↓ <u>A</u> <u>E</u> ...	0,997
H3	27	14,1	<u>M</u> <u>K</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>R</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>H</u> <u>T</u> <u>P</u> <u>A</u> <u>F</u> <u>G</u> ↓ <u>V</u> <u>K</u> ...	1,000
H16	25	13,1	<u>M</u> <u>A</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>N</u> <u>S</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>A</u> ↓ <u>A</u> <u>A</u> ...	0,999
H6	16	8,4	<u>M</u> <u>R</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>Y</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>H</u> <u>A</u> ↓ <u>F</u> <u>I</u> ...	0,999
H4	13	7,8	<u>M</u> <u>R</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>Q</u> <u>R</u> <u>R</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>M</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>V</u> <u>A</u> ↓ <u>D</u> <u>V</u> ...	0,999
H7	7	3,7	<u>M</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>F</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>R</u> <u>A</u> ↓ <u>Q</u> <u>E</u> ...	0,999
H1	6	3,1	<u>M</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>F</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>G</u> ↓ <u>S</u> <u>P</u> ...	0,999
H8	6	3,1	<u>M</u> <u>A</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>F</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>Y</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>G</u> <u>Q</u> <u>Q</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>R</u> <u>A</u> ↓ <u>Q</u> <u>N</u> ...	1,000
H9	6	3,1	<u>M</u> <u>I</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>W</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>I</u> <u>M</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>P</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>R</u> <u>P</u> ↓ <u>A</u> <u>A</u> ...	0,985
H11	5	2,6	<u>M</u> <u>L</u> <u>Q</u> <u>R</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>P</u> <u>P</u> <u>I</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>M</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>G</u> ↓ <u>N</u> <u>S</u> ...	0,972
H32	4	2,1	<u>M</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>A</u> ↓ <u>A</u> <u>A</u> ...	1,000
H27	3	1,6	<u>M</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>F</u> <u>W</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>P</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>S</u> ↓ <u>S</u> <u>E</u> ...	1,000
H13	2	1,1	<u>M</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>V</u> <u>Y</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>F</u> <u>A</u> <u>I</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>F</u> <u>P</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>M</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>A</u> ↓ <u>M</u> <u>E</u> ...	0,969
H36	2	1,1	<u>M</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>F</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>M</u> <u>R</u> <u>H</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>D</u> <u>A</u> ↓ <u>L</u> <u>S</u> ...	0,578
H10	1	0,5	<u>M</u> <u>T</u> <u>Y</u> <u>V</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>F</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>H</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>A</u> ↓ <u>I</u> <u>S</u> ...	1,000
H14	1	0,5	<u>M</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>P</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>F</u> <u>R</u> <u>K</u> <u>D</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>R</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>F</u> <u>W</u> <u>F</u> <u>I</u> <u>P</u> <u>Q</u> <u>D</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>A</u> ↓ <u>L</u> <u>T</u> ...	0,947
H15	1	0,5	<u>M</u> <u>K</u> <u>F</u> <u>F</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>R</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>I</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>N</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>G</u> ↓ <u>I</u> <u>W</u> ...	0,986
H24	1	0,5	<u>M</u> <u>H</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>M</u> <u>F</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>A</u> ↓ <u>H</u> <u>R</u> ...	0,961
H25	1	0,5	<u>M</u> <u>G</u> <u>R</u> <u>I</u> <u>R</u> <u>R</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>I</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>P</u> <u>R</u> <u>D</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>E</u> <u>A</u> ↓ <u>W</u> <u>L</u> ...	0,943
H28	1	0,5	<u>M</u> <u>G</u> <u>Q</u> <u>M</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>F</u> <u>K</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>P</u> <u>V</u> <u>E</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>E</u> <u>N</u> <u>A</u> ↓ <u>G</u> <u>Q</u> ...	0,993
H29	1	0,5	<u>M</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>P</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>H</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>E</u> <u>Q</u> <u>G</u> <u>Q</u> <u>S</u> ↓ <u>D</u> <u>P</u> ...	0,984
H34	1	0,5	<u>M</u> <u>R</u> <u>R</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>I</u> <u>E</u> <u>V</u> <u>Q</u> <u>G</u> ↓ <u>K</u> <u>K</u> ...	0,984
H35	1	0,5	<u>M</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>F</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>N</u> <u>A</u> ↓ <u>S</u> <u>D</u> ...	0,999
H39	1	0,5	<u>M</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>M</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>A</u> ↓ <u>S</u> <u>S</u> ...	0,997
H48	1	0,5	<u>M</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>M</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>A</u> ↓ <u>A</u> <u>P</u> ...	1,000

Die Tabelle ist nach der Anzahl (n) bzw. Prozent (%) der gefundenen Sequenzen sortiert. Pfeil (↓): vorausgesagte Signalpeptidase-Schnittstellen, p: Wahrscheinlichkeit der Voraussage mit SignalP-HMM (Nielsen und Krogh, 98). Startmethionin in fett, hydrophobe Aminosäuren unterstrichen.

In Tabelle 5 sind die N-terminalen Signalsequenzen und die prognostizierten Peptidaseschnittstellen der 25 Klone dargestellt. Wie es für Signalsequenzen zu erwarten war, enthielten die Peptide zahlreiche hydrophobe Aminosäuren. Das Auffällige bei der Betrachtung der Häufigkeitsverteilung der einzelnen Sequenzen war, dass die fünf häufigsten cDNA-Sequenzen (H3, H3, H16, H6, H4) ca. 58 % der gesamten identifizierten Sequenzen umfassten (Tab. 5). Der Vergleich der 25 identifizierten Sequenzen mit einer Liste der 25 häufigsten *E. tenella*-EST-Sequenzen (<http://www.cbil.upenn.edu/apidots/pub/SupTable1Top25.html>) ergab, dass acht Sequenzen (H2/H4/H13/H24/H25/H29/H35/H36) übereinstimmten. Die Reihenfolge der Häufigkeitsverteilung war jedoch unterschiedlich. Beispielsweise wurden die Sequenzen H2 und H4, die in der vorliegenden Arbeit zu den fünf häufigsten Sequenzen zählten, in der Datenbank lediglich auf Rang 10 und 19 aufgelistet. Die drei übrigen Sequenzen, die in der vorliegenden Arbeit zu den fünf häufigsten zählten, waren nicht in der Datenbank enthalten.

#### 2.1.2.3 Analyse der identifizierten cDNA-Sequenzen

Zur Identifizierung der *E. tenella*-Sequenzen wurden cDNA-Fragmente mit der Größe von 200-800 bp eingesetzt, so dass nicht erwartet werden konnte, vollständige Transkripte zu erhalten. Im vorliegenden Fall umfassten die 191 Sequenzen durchschnittlich ca. 431 bp. Um dennoch mehr Sequenzinformationen zu erhalten, wurden die 25 identifizierten Nukleinsäuresequenzen mit einer EST-Datenbank von *E. tenella* ([http://www.tigr.org/tigr-scripts/tgi/T\\_index.cgi?species=e\\_tenella](http://www.tigr.org/tigr-scripts/tgi/T_index.cgi?species=e_tenella)) mittels blastn-Algorithmus (Altschul et al., 97) abgeglichen.

In dieser Datenbank sind *E. tenella*-EST eingetragen, die jeweils etwa zur Hälfte aus Sporozoiten- oder Merozoiten-cDNA stammen und zu sogenannten Contigs zusammengefasst sind. Mit einer Ausnahme (H39) konnte jeder Sequenz ein *E. tenella*-EST-Contig (TC) oder eine einzelne EST-Sequenz zugeordnet werden (Tab. 6). Die korrespondierenden Contig-Sequenzen wurden auf die Stadienherkunft ihrer zugrunde liegenden EST hin analysiert (d.h. Sporozoiten- oder Merozoiten-cDNA). Dabei wurde festgestellt, dass 18 Contigs überwiegend aus Sporozoiten-EST zusammengesetzt waren und nur drei Contigs mehrheitlich aus Merozoiten-EST. Für fünf Sequenzen war die Anzahl der EST < 5, was als zu gering angesehen wurde, um eine Aussage zu treffen. Um die Aussage noch deutlicher zu gestalten, wurde

überprüft, wie viele Sequenzen einen fünffachen Unterschied in ihrer EST-Verteilung zwischen Sporozoiten und Merozoiten zeigten. Die Analyse ergab, dass zwölf Contigs aus einer fünffach höheren Anzahl von Sporozoiten-EST und lediglich ein Contig aus einer fünffach höheren Anzahl von Merozoiten-EST zusammengesetzt war.

Tab. 6: Datenbankabgleich der 25 experimentell identifizierten sekretorischen *Eimeria tenella*-Sequenzen.

Klon	Contig/EST (blastn)	Stadium			ORF	AS	Homologie (Accession number, EMBL)	E-value (blastx)
		Sp	Me	bp				
H2	TC2829	50	0	737	112-737	208	-	> e-3
H3	TC2128	38	0	1120	131-788	219	-	> e-3
H16	TC2153	31	0	926	100-740	213	-	> e-3
H6	TC2921	15	0	1225	349-1235	266	-	> e-3
H4	TC2853	33	0	1843	94-1317	407	-	> e-3
H7	TC2827	70	5	1691	237-1000	254	E.t. TA4 (M21088)	7 e-10
H1	TC3237	5	0	679	61-661	200	P.f. Ca <sup>2+</sup> -Protein (M77834)	2 e-16
H8	TC2164	22	0	1415	92-852	253	E.t. TA4 (M21088) = EtSAG1	identisch
H9	BG929984	1	0	593	66-282	72	N.c. Serpin (Q8MZJ9)	4 e-6
H11	TC2915	11	5	937	129-913	261	E.t. TA4/EtSAG10 (Q70CC2)	2 e-10/identisch
H32	TC2380	1	4	345	31-345	105	-	> e-3
H27	TC2144	29	5	873	396-873	158	E.t. TA4 (M21088)	e-9
H13	TC2101	123	39	1281	353-1280	308	Serpin (O08797)	2 e-32
H36	TC2836	55	0	2219	226-1748	507	-	> e-3
H10	TC2807	0	16	772	107-627	173	-	> e-3
H14	TC2460	1	2	884	55-314	86	-	> e-3
H15	TC3177	2	1	809	200-654	151	E.t. MIC3 (Q6R5NO)	2 e-13
H24	TC2125	37	22	1878	547-1387	281	Phosphatase 2b (O14495)	2 e-26
H25	TC2115	18	53	3460	397-3195	932	E.t. MIC5 (Q9U966)	identisch
H28	TC2170	27	0	1270	49-848	266	E.t. TA4 (M21088)	e-4
H29	TC2188	18	4	657	405-656	83	-	> e-3
H34	TC2796	2	0	410	58-410	117	-	> e-3
H35	TC2817	108	147	1075	94-593	166	-	> e-3
H39	-	0	0	195	64-195	45	-	> e-3
H48	TC2876	25	0	789	104-789	228	-	> e-3

Contig/EST-Nr. aus einer *E. tenella*-EST-Datenbank ([http://www.tigr.org/tigr-scripts/tgi/T\\_index.cgi?species=e\\_tenella](http://www.tigr.org/tigr-scripts/tgi/T_index.cgi?species=e_tenella)) und die Stadienverteilung der EST. Sp: Sporozoiten; Me: Merozoiten; bp: Basenpaare; ORF: *open reading frame*; AS: Anzahl der Aminosäuren des ORF.

Daneben wurde die Sequenzinformation für eine blastx-basierte Homologiesuche in Proteindatenbanken genutzt. Die Analyse ergab, dass lediglich elf der 25 Sequenzen

signifikante Übereinstimmungen zu bekannten Proteinen in öffentlichen Datenbanken zeigten (Tab. 6). Die Sequenz H1 wies Homologien zu einem  $\text{Ca}^{2+}$ -bindenden Protein von *P. falciparum* auf. Bei den Proteinen H9 und H13 handelte es sich um unabhängige Sequenzen, die beide Homologien mit Sequenzen von Serin-Protease-Inhibitoren (Serpine) aufwiesen. Demnach existieren bei *E. tenella* vermutlich mindestens zwei unterschiedliche, sekretierte Serpine. Der Klon H24 zeigte Homologien zu einer Phosphatidat-Phosphatase (PAP), die eine Schlüsselfunktion in der Synthese anderer Phosphoglyceride einnimmt. H15 zeigte Ähnlichkeiten zum *E. tenella*-Protein EtMIC3, so dass auch H15 in den Mikronemen lokalisiert sein könnte. Es konnte ebenfalls das EtMIC5-Protein identifiziert werden (H25), ein Mikronemenprotein von *E. tenella* mit bisher unbekannter Funktion (Ryan et al., 00). Des Weiteren wurde die cDNA-Sequenz (H8) von TA4 gefunden. Hierbei handelt es sich um das Hauptoberflächenprotein von *E. tenella*-Sporozoiten, das bei Sporozoiten etwa 1% der membranassoziierten Proteine umfasst (Files et al., 87). Interessanterweise wurden noch weitere vier cDNA-Sequenzen (H7, H11, H27, H28) gefunden, die in der blastx-Analyse Ähnlichkeiten mit dem TA4-Protein aufwiesen. Insgesamt stellten 22 der 162 (ca. 13 %) identifizierten Sequenzen TA4 oder TA4-ähnliche Moleküle dar, die nach der EST-Analyse vermutlich stadienspezifisch (oder dominant) in Sporozoiten exprimiert werden (Tab. 6) (siehe auch Abschnitt 2.1.1.4). Ein Sequenzvergleich mit 23 kürzlich beschriebenen TA4-ähnlichen Proteinen (EtSAG1-23) (Tabares et al., 04) mittels clustelW-Programm in der Computersoftware MacVector (PharmacoPeia, USA) ergab, dass H11 der SAG10-Sequenz entsprach. In der Publikation (Tabares et al., 04) ist TA4 in SAG1 umbenannt worden und somit identisch mit H8. Die weiteren TA4-ähnlichen Sequenzen H7, H27 und H28 zeigten keine Übereinstimmung zu einer der 23 beschriebenen SAG-Sequenzen.

Des Weiteren wurde in einem blastn-basierten Vergleich festgestellt, dass sechs von 25 Sequenzen auch mit der bioinformatischen Methode identifiziert wurden. Hierzu zählen H1 (= Contig 2122), H8 (= Contig 145), H11 (= Contig 142), H24 (= Contig 127), H25 (= Contig 124) und H27 (= Contig 67). Für diese bioinformatisch identifizierten Sequenzen konnte somit die Funktion der N-terminalen Signalsequenz durch die Hefemethode direkt bestätigt werden.

## 2.2 DNA-Immunisierungsstudien mit den *E. tenella*-Antigenen SO7, TA4 und EtMIC1 bei Hühnern

In der vorliegenden Arbeit sollte ein DNA-Immunisierungsprotokoll erstellt werden, anhand dessen neue *E. tenella*-Antigene in Form von DNA-Vakzinen getestet werden sollten. Die Applikation von Antigenen durch Plasmid-DNA bietet einige Vorteile gegenüber anderen rekombinanten Vakzinen. Sie aktiviert beispielsweise im Gegensatz zur Immunisierung mit rekombinanten Proteinen auch eine starke CD8<sup>+</sup>-T-Zellantwort (Gurunathan et al., 00). Damit ist ein besserer Immunisierungserfolg bei Eimerieninfektionen zu erwarten. Zusätzlich bietet die DNA-Immunisierung den Vorteil der relativ einfachen Herstellung großer Mengen Ausgangsmaterials.

Die Etablierung des DNA-Immunisierungsprotokolls beinhaltete neben der Verwendung von zwei unterschiedlichen Vektoren (pCDNA3 und pVR1012) auch den Einsatz des stabilisierenden, heterologen Fusionspartners *enhanced green fluorescent protein* (EGFP). Des Weiteren wurden Koimmunisierungen mit Vektoren durchgeführt, welche die genetische Information für die inflammatorischen Hühnerzytokine IFN- $\gamma$  (chIFN- $\gamma$ ) und IL-18 (chIL-18) tragen. Für die Klonierung der DNA-Vektoren wurden die drei in unserer Analyse identifizierten und schon bekannten sekretorischen *E. tenella*-Proteine TA4 (Brothers et al., 88), SO7 (Miller et al., 89) und EtMIC1 (Tomley et al., 91) eingesetzt.

Aufgrund der Erkenntnisse aus früheren Arbeiten wurden einige Standardparameter der DNA-Immunisierung festgesetzt und in den Versuchen nicht mehr variiert. Zum einen wurde die DNA intramuskulär mit einer Dosis von 100  $\mu$ g/Tier (in 0,9% NaCl) appliziert. Um zu gewährleisten, dass die Hühner während der ersten Immunisierung ein voll entwickeltes Immunsystem besaßen wurde zum anderen jeweils mit drei Wochen alten Tieren gearbeitet.

In einem vergleichenden Experiment wurden Hühner mit den bakteriell exprimierten Antigenen SO7 und TA4 parenteral immunisiert.

Der Immunisierungserfolg sollte durch die zeitliche Analyse der spezifischen Serokonversion mittels ELISA überprüft werden. Die zelluläre Immunreaktion sollte anhand der T-Zellproliferation und durch Oozystenverminderung nach einer Belastungsinfektion analysiert werden.

## 2.2.1 Konstruktion der DNA-Immunisierungsvektoren und Überprüfung der Plasmide in der Zellkultur

### 2.2.1.1 Konstruktion und Überprüfung von Plasmiden mit den Genen für die sekretorischen *E. tenella*-Proteine SO7, TA4 und EtMIC1

Die Zielvektoren für die DNA-Immunisierung pCDNA3 (Invitrogen, USA) und pVR1012 (Vical, USA) werden häufig in Immunisierungsstudien eingesetzt. Sie unterscheiden sich in einer Cytomegalivirus (CMV)-5'-Intronsequenz, die sich an die Promotorsequenz von pVR1012 anschließt. Diese soll zu einer verbesserten Expressionsrate beitragen (Hartikka et al., 96). Beide Vektoren sind mit dem CMV-Promotor/Enhancer und einer *bovine growth hormone* (BGH)-Terminationsstelle ausgestattet, wodurch die Proteinexpression in eukaryotischen Zellen ermöglicht wird.

Die cDNA-Sequenzen von SO7, TA4 und EtMIC1 wurden alleine bzw. in Fusion mit EGFP in beide Plasmide kloniert. Aufgrund der hohen Proteinstabilität und Widerstandsfähigkeit gegen Proteaseabbau ist EGFP als Fusionspartner besonders geeignet (Cubitt et al., 95). Es sollte untersucht werden, ob durch die erhöhte Proteinstabilität eine Verstärkung der Antikörperantwort gegen das Eimerienprotein erreicht werden kann. Als Nebeneffekt konnte das EGFP auch als Reporter für die Proteinexpression eingesetzt werden.

Zunächst war es notwendig die cDNA-Sequenzen mittels PCR zu amplifizieren, wobei der für die N-terminale Signalsequenz kodierende Bereich nicht berücksichtigt wurde. Da in den DNA-Immunisierungsvektoren unterschiedliche multiple Klonierungsstellen (MCS) vorlagen, mussten die PCR-Produkte mit entsprechenden flankierenden Restriktionsschnittstellen versehen werden (Klonierungsschema siehe Abb. 9). Die Klonierung in pCDNA3 wurde über HindIII/XbaI durchgeführt und für pVR1012 kamen die Enzyme BamHI/XbaI zum Einsatz. Die Herstellung der EGFP-Fusionskonstrukte fand über einen zusätzlichen Klonierungsschritt statt. Dazu wurde der Vektor pN1 (BD Clontech, Heidelberg) eingesetzt. Er besitzt vor dem 5'-Ende der EGFP-Sequenz eine Klonierungsstelle, wodurch die resultierenden Fusionsproteine den heterologen Sequenzanteil am N-Terminus tragen. Mit den Enzymkombinationen HindIII/XbaI und Eco47III/XbaI konnten dann die Fusionskonstrukte erfolgreich in die

Vektoren pCDNA3 und pVR1012 umkloniert werden.

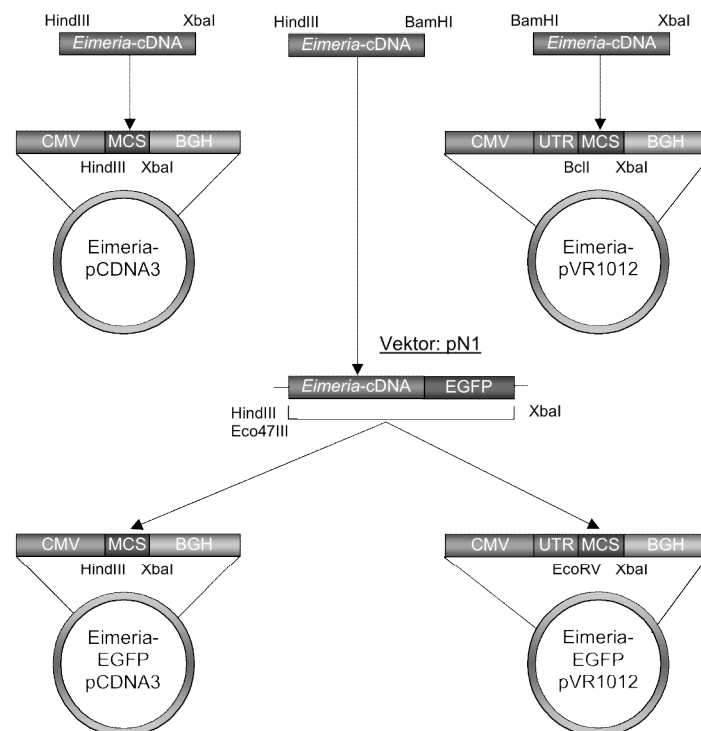


Abb. 9: Klonierungsschema der DNA-Immunisierungsvektoren mit cDNA-Sequenzen von SO7, TA4 und EtMIC1.

Zur Bestätigung der Klonierung wurden die Konstrukte mittels Restriktionsverdau überprüft und die pCDNA3-Vektoren mit den Enzymen HindIII/XbaI geschnitten. Durch die Klonierung der pVR1012-Konstrukte wurden die Restriktionsschnittstellen am 5'-Ende zerstört, so dass die Restriktionsanalysen mit dem im flankierenden Bereich schneidenden Enzym PstI und XbaI vorgenommen wurden. Zu berücksichtigen war auch, dass SO7 und EtMIC1 zwei bzw. drei Erkennungssequenzen für PstI besitzen. In der Tat ließen sich die einzelnen DNA-Fragmente in den jeweiligen Restriktionsansätzen wiederfinden, sowie auch die linearisierten Plasmide, die eine Größe von ca. 5,4 kb (pCDNA3) bzw. 4,9 kb (pVR1012) besitzen (Daten nicht gezeigt). Zur zusätzlichen Überprüfung wurden die generierten Konstrukte sequenziert und die korrekte Klonierung bestätigt.

Die Proteinexpression der konstruierten Vektoren wurde in transfizierten eukaryotischen Zellen mittels Immunblotanalysen, RT-PCR-Experimenten und Fluoreszenzmikroskopie analysiert.

Die Überprüfung der fusionsfreien (ohne EGFP) Eimerienkonstrukte im Immunblot mit einem anti-*E. tenella*-Serum zeigte für die EtMIC1-Konstrukte (in beiden Vektoren) ein Signal auf der Höhe des erwarteten Molekulargewichtes von ca. 100 kDa. Wie in Abbildung 10 (Spur 1 und Spur 2) zu erkennen ist, wurde im pVR1012-Ansatz eine einzelne Proteinbande erkannt, hingegen im pCDNA3-Ansatz zwei dicht nebeneinanderliegende Proteinbanden detektiert (Abb. 10). Im Gegensatz dazu konnten für die Konstrukte von SO7 und TA4 keine spezifischen Proteinsignale detektiert werden, dies galt sowohl für pCDNA3 als auch für pVR1012 (Abb. 10). Um etwa gleiche Transfektionsbedingungen zu gewährleisten, wurden COS-7-Zellen des gleichen Ansatzes verwendet und die Konstrukte unter gleichen Bedingungen transfiziert. Üblicherweise wurden Transfektionseffizienzen von ca. 20-40% erreicht.

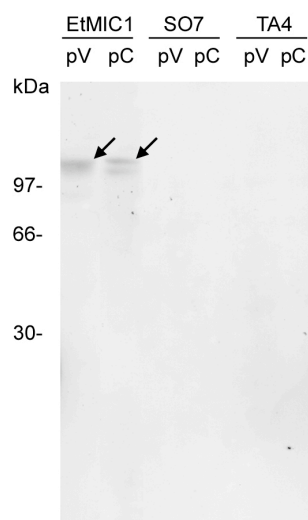


Abb. 10: Immunblotanalyse der fusionsfreien Konstrukte in COS-7-Zellen mit anti-*Eimeria tenella*-Serum.

Transfektion von COS-7-Zellen mit fusionsfreien SO7-, TA4- oder EtMIC1-Konstrukten. Pro Spur wurden äquivalente Mengen von ca.  $5 \times 10^4$  Zellen aufgetragen. pV: pVR1012, pC: pCDNA3.

Um aufzuklären, ob die Transfektion der Zellen tatsächlich zur Transkription spezifischer mRNA führte, wurde die RNA von COS-7-Zellen mittels RT-PCR untersucht. Das Ergebnis zeigte, dass mit beiden Vektoren die unterschiedlichen Eimeriensequenzen transkribiert werden konnten (Abb. 11). Im Agarosegel ist zu erkennen, dass in jedem Ansatz die spezifischen cDNA-Fragmente erwarteter Größe detektiert wurden. Die stärksten Signale wurden bei den EtMIC1-Konstrukten und TA4-pVR1012 detektiert. Schwächere Signale zeigten die SO7-Konstrukte und TA4-



pCDNA3. Daraus kann geschlossen werden, dass die Transfektion erfolgreich verlief und eine Transkription stattfand. Wie zudem die Restriktionsanalyse und die Sequenzierung zeigte, waren die Plasmide erfolgreich und ohne Verschiebung des Leserahmens kloniert worden. Aufgrund dieser Resultate kann vermutet werden, dass die Proteinexpression von SO7 und TA4 unter der Nachweisgrenze des Immunblots lag.

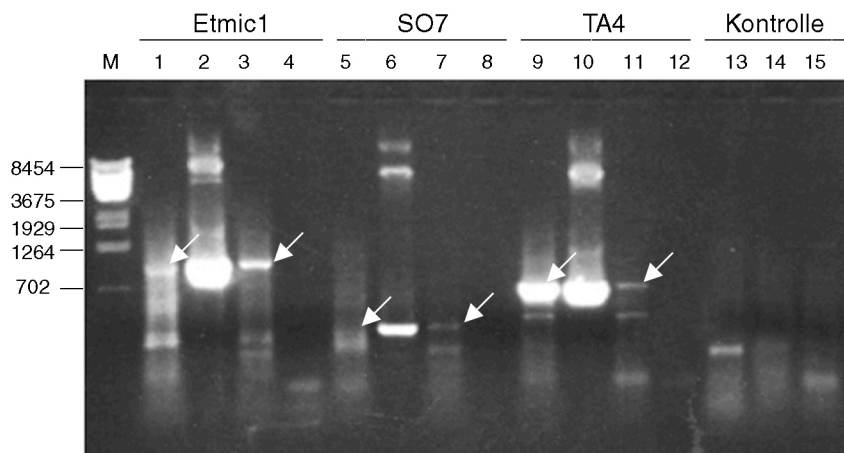


Abb. 11: RT-PCR-Analyse der Transkription von Eimeriengenen in COS-7-Zellen.

Transfektion von COS-7-Zellen mit SO7-, TA4- oder EtMIC1-Konstrukten. Nach 18 h wurde eine genspezifische RT-PCR aus Gesamt-RNA durchgeführt und im Agarosegel (0,8%) aufgetrennt. pCDNA3-Konstrukte: 1, 5, 9; pVR1012-Konstrukte: 3, 7, 11; Positivkontrolle (PCR mit Vektor): 2, 6, 10; Negativkontrollen (PCR ohne cDNA): 4, 8, 12; Negativkontrollen (PCR mit COS-7-cDNA aus Zellen, die mit leeren Vektoren transfiziert wurden): 13, 14, 15. Weiße Pfeile zeigen das erwartete Signal. M: DNA-Marker in bp.

Die Fusionskonstrukte (mit EGFP) wurden im Immunblot mit einem Maus-anti-EGFP-Serum und einem Kaninchen-anti-*E. tenella*-Serum getestet (Abb. 12). Mit dem anti-EGFP-Serum konnten die erwarteten, spezifischen Signale der Fusionsproteine von ca. 49 kDa (SO7-EGFP), 52 kDa (TA4-EGFP) bzw. 127 kDa (EtMIC1-EGFP) nachgewiesen werden (Abb. 12A). Die Zelllysate von SO7-EGFP in pCDNA3 (Abb. 12A, Spur 4) zeigten zwei weitere Banden, die ober- und unterhalb der dominanten Bande erkannt wurden. Im Ansatz TA4-EGFP in pCDNA3 (Abb. 12A, Spur 5) wurde ein zusätzliches Signal unterhalb des erwarteten Signals detektiert. Auch in der EGFP-Positivkontrolle im Vektor pCDNA3 (Abb. 12A, Spur 7) wurden zwei dicht nebeneinander liegende Proteinbanden erkannt. Der Ansatz mit EtMIC1-EGFP in pCDNA3 und die verschiedenen pVR1012-Ansätze zeigten neben sehr schwachen,

unspezifischen Reaktionen distinkte singuläre Proteinsignale. Wie die Intensität der Signale zeigt, wurden vermutlich unterschiedliche Proteinmengen in den einzelnen Ansätzen exprimiert, obwohl die Transfektionseffizienz für alle Ansätze bei etwa 20-30 % lag.

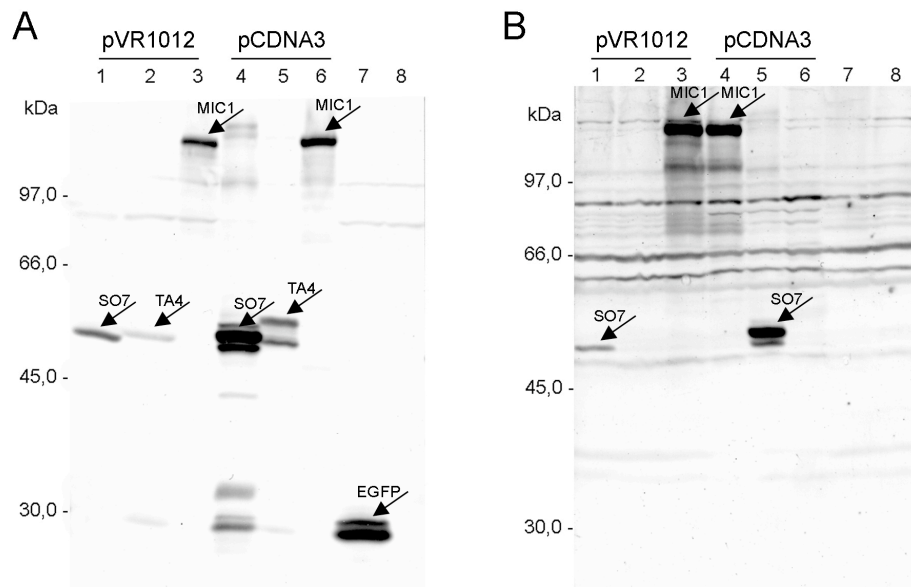


Abb. 12: Immunblotanalyse der EGFP-Fusionskonstrukte in COS-7-Zellen.

A: Anti-EGFP-Serum. B: Anti-*Eimeria tenella*-Serum.

Transfektion von COS-7-Zellen mit EGFP-Fusionskonstrukten. Aufgetragen wurden pro Spur äquivalente Mengen von etwa  $1 \times 10^5$  Zellen. SDS-PAGE mit 5%-20% Gradientengel. SO7-EGFP-pVR1012 (A1, B1), SO7-EGFP-pCDNA3 (A4, B5). TA4-EGFP-pVR1012 (A2, B2). TA4-EGFP-pCDNA3 (A5, B6). EtMIC1-EGFP-pVR1012 (A3, B3). EtMIC1-EGFP-pCDNA3 (A6, B4). Kontrollen: EGFP-pCDNA3 (A7, B7). Vektorkontrolle mit einer Mischung aus pCDNA3 und pVR1012 (A8, B8).

Im Immunblot mit dem Kaninchen-anti-*E. tenella*-Serum wurden in den gleichen Zellextrakten, entsprechend dem vorangegangenen Experiment (mit EGFP-Antiserum), die SO7 und EtMIC1-Fusionsproteine detektiert (Abb. 12B). Unerwartet jedoch war, dass die TA4-Fusionsproteine bei gleicher Proteinmenge des gleichen Transfektionsansatzes im Gegensatz zum EGFP-Antiserum keine Reaktion zeigten (Abb. 12B, Spur 2 und 6). Dies trat zudem unabhängig vom eingesetzten Vektor auf. Wie in den übrigen Ansätzen wurden die Zellextrakte von ca.  $1 \times 10^5$  COS-7-Zellen getestet. Der Vergleich mit dem EGFP-Antiserum ergab, dass die TA4-Proteinbande des pVR1012-Vektors (Abb. 12A, Spur 2) nur ein schwaches Signal zeigte und demnach die Proteinmenge für die Detektion durch das anti-*E. tenella*-Serum möglicherweise nicht genügte. Jedoch wurde auch das Fusionsprotein von TA4-

EGFP in pCDNA3 nicht erkannt, obwohl die Reaktion mit dem anti-EGFP-Serum deutlich nachweisbar war (Abb. 12A Spur 5). Hinzuzufügen ist, dass es sich bei den eingesetzten Seren um nicht-aufgereinigte Blutseren aus der Maus bzw. dem Kaninchen handelte und somit vergleichbare Bedingungen vorherrschten. Des Weiteren spricht die Tatsache, dass die TA4-Fusionsproteine vom EGFP-Serum auf der Höhe des erwarteten Molekulargewichtes detektiert wurden, gegen eine Verschiebung des Leserasters und gegen eine vorzeitige Translationsunterbrechung. Vermutlich waren wesentliche Epitope im Fusionsprotein nicht zugänglich, so dass die Antikörperbindung verhindert wurde.

Ein Vergleich der Immunblotexperimente zeigte, dass die Eimerienproteine durch die Fusion mit EGFP an Stabilität gewonnen haben. Vermutlich sind für die negativen Immunblotergebnisse der fusionsfreien SO7- und TA4-Konstrukte eine Kombination aus geringer Proteinstabilität und limitierter Expressionsmenge verantwortlich.

Der Einsatz des EGFP ergab auch die Möglichkeit, die Genexpression der Fusionsproteine über Fluoreszenzmikroskopie zu ermitteln. Neben COS-7-Zellen wurden für diese Arbeiten auch Zellen der Hühnerzelllinie HD11 (Beug et al., 79) mit den unterschiedlichen Fusionskonstrukten transfiziert (Abb. 13, Abb. 14).

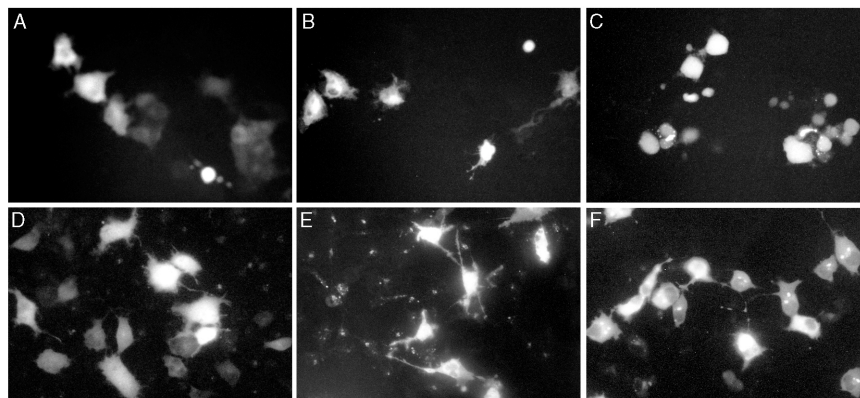


Abb. 13: Expression von EGFP-Fusionsproteinen in COS-7-Zellen.

Transfektion von COS-7-Zellen mit EGFP-Fusionskonstrukten: EtMIC1 (A, D), TA4 (B, E) und SO7 (C, F). pCDNA3: A, B, C; pVR1012: D, E, F. Nach 48 h wurde die spezifische EGFP-Fluoreszenz im Fluoreszenzmikroskop (1:400) überprüft.

Es zeigte sich, dass sämtliche Fusionskonstrukte in beiden Zelllinien zur EGFP-Expression führten. Da es sich bei der HD11-Zelllinie um eine Hühnermonozyten-

Zelllinie handelt, für die keine optimierten Transfektionssysteme und Protokolle vorlagen, war die Proteinexpression und Transfektionsrate hier etwas niedriger. Wichtig war die qualitative Beurteilung der Proteinexpression in HD11-Zellen, die zeigte, dass die getesteten Vektoren zur Immunisierung von Hühnern geeignet waren und *in vivo* die Proteinexpression der Fremdproteine erwartet werden durfte.

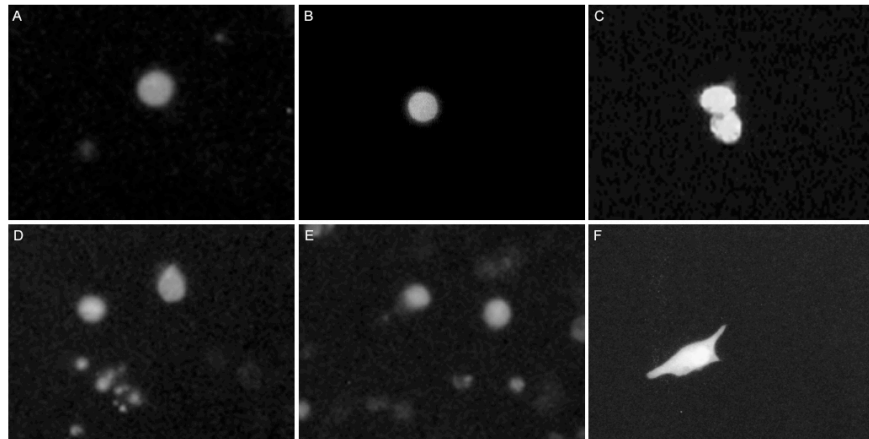


Abb. 14: Expression von EGFP-Fusionsproteinen in HD11-Zellen.

Transfektion von HD11-Zellen mit den EGFP-Fusionskonstrukten: EtMIC1 (A, D), TA4 (B, E) und SO7 (C, F). pCDNA3: A, B, C; pVR1012: D, E, F. Nach 48 h wurde die spezifische EGFP-Fluoreszenz im Fluoreszenzmikroskop (1:400) überprüft.

#### 2.2.1.2 Konstruktion und Überprüfung von Vektoren mit den Hühnergenen der proinflammatorischen Zytokine chIFN- $\gamma$ und chIL-18.

Da Zytokine eine essentielle Rolle bei der Differenzierung von Effektor-T-Zellen spielen, kann Plasmid-DNA, die kostimulierende Moleküle exprimiert, zur Verstärkung der Immunreaktion eingesetzt werden (Gurunathan et al., 00). Um bei zukünftigen DNA-Immunisierungen solche Vektoren einsetzen zu können, wurden die zwei für Eimerieninfektionen interessanten Hühnerzytokine chIFN- $\gamma$  und chIL-18 kloniert bzw. in der Zellkultur überprüft.

Die cDNA von chIFN- $\gamma$  wurde aus stimulierten Hühnermilzzellen (48 h mit Concanvalin A (ConA), 25  $\mu$ g/ml) mittels RT-PCR isoliert. Hierzu wurde die Gesamt-RNA von stimulierten Zellen aufgereinigt und in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurde der kodierende Bereich der chIFN- $\gamma$ -Sequenz mittels PCR amplifiziert. Zur

gezielten Klonierung in den Zielvektor pCDNA3 wurden die Restriktionsenzyme EcoRI/XbaI genutzt. Für den Vektor pVR1012 kamen die Enzyme SalI/XbaI zum Einsatz. Zur Überprüfung der chIFN- $\gamma$ -Expression wurden dann COS-7-Zellen mit den generierten Plasmiden transfiziert und chIFN- $\gamma$  im Überstand nachgewiesen (Abb. 15). Hierzu wurde ein Biotest mit einer Hühnermonozytenzelllinie (HD11) angewendet, deren Stimulation durch chIFN- $\gamma$  die Produktion von Stickoxid-Verbindungen anregt, welche schließlich als Nitrit im Zellüberstand nachweisbar sind. Mit der sogenannten Griess-Reaktion kann das freigesetzte Nitrit quantitativ bestimmt werden.

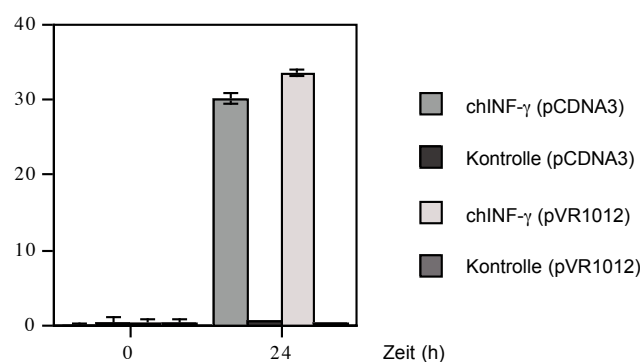


Abb. 15: Nachweis von chIFN- $\gamma$  in COS-7-Zellkulturüberständen.

Mit den Zellkulturüberständen (24h) transfizierter COS-7-Zellen wurden HD11-Zellen stimuliert und das freigesetzte Nitrit mit der Griess-Reaktion quantifiziert.

Der Versuch zeigte, dass der Überstand der mit den chIFN- $\gamma$ -Konstrukten transfizierten COS-7-Zellen große Mengen chIFN- $\gamma$  enthielt (Abb. 15). Im Gegensatz zu den Kontrollen, in denen nur ca. 1-2  $\mu$ M Nitrit nachweisbar waren, lagen die Nitritkonzentrationen beider chIFN- $\gamma$ -Konstrukte bei ca. 30  $\mu$ M.

Die chIL-18-Sequenz lag bereits im Vektor pCDNA3 vor (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von K. Schneider, Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Universität Freiburg). Um das Konstrukt in der Zellkultur testen zu können, wurden COS-7-Zellen mit chIL-18-pCDNA3 transfiziert und nach 24 h der Zellkulturüberstand zur Stimulierung von Hühnermilzzellen (isoliert aus 3 Wochen alten Hühnern) eingesetzt. Da chIL18 bei CD4<sup>+</sup>-T-Zellen unter anderem zur Sekretion von chIFN- $\gamma$  führt (Gobel et al., 03), kann die Aktivität von chIL-18 indirekt über den Nachweis von

chIFN- $\gamma$  im Überstand von aktivierten T-Zellen erfolgen. Nach einer Inkubation von 24 h erfolgte die Überprüfung der Milzzellüberstände auf chIFN- $\gamma$ -Freisetzung im Biotest mit HD11-Zellen. Das Ergebnis zeigte, dass die Milzzellen eines Spendertieres zur chIFN- $\gamma$ -Sekretion stimuliert wurden, was sich im Vergleich zur Kontrolle in einem dreifach höheren Nitritwert niederschlug (Abb. 16). Die Zellen des zweiten Tieres hingegen zeigten keine chIFN- $\gamma$ -Freisetzung. Zur Kontrolle der allgemeinen T-Zellreaktivität wurden die isolierten Milzzellen in separaten Näpfen mit ConA stimuliert, was bei den Zellen beider Tiere zur chIFN- $\gamma$ -Produktion führte (Abb. 16). Ebenso wurde eine Transfektionskontrolle in COS-7-Zellen mit dem Konstrukt chIFN- $\gamma$ -pCDNA3 durchgeführt. Hierbei konnte chIFN- $\gamma$  im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden und bestätigte die erfolgreichen Transformationbedingungen. Möglicherweise ist die fehlende Reaktion der Zellen eines Spendertieres auf geringe kostimulatorische Faktoren in der Milzzellpopulation zurückzuführen. Aufgrund des begrenzten Tiermaterials und aufgrund der positiven Sequenzanalyse des chIL18-Vektors, die zeigte, dass die vollständige chIL18 Sequenz vorlag, wurden in der vorliegenden Arbeit keine zusätzlichen Milzzellpopulationen getestet.

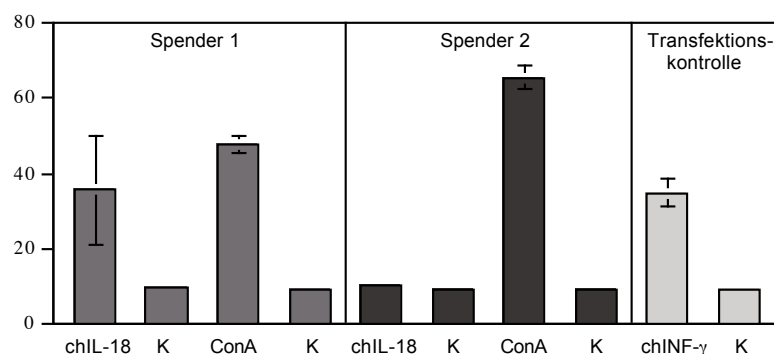


Abb. 16: Aktivitätstest von chIL-18.

Hühnermilzzellen von zwei Tieren (Spender 1 und 2) wurden entweder mit den Zellkulturüberständen (24h) von mit chIL-18-pCDNA3 transfizierten COS-7-Zellen oder mit ConA (25 $\mu$ g/ml) für 24h stimuliert und das freigesetzte chIFN- $\gamma$  mit dem HD11-Biotest quantifiziert. Als Transfektionskontrolle wurden COS-7-Zellen mit chIFN- $\gamma$ -pCDNA3 transfiziert und der Überstand im Biotest überprüft. K: pCDNA3, ConA: Concanavalin A.

## 2.2.2 Immunisierung von Hühnern mit Eimerien-DNA-Konstrukten und rekombinantem SO7- und TA4-Protein

Zur DNA-Immunisierung von Hühnern wurden die unterschiedlichen Eimeriensequenzen SO7, TA4 und EtMIC1 als EGFP-Fusionskonstrukte im Vektor pCDNA3 eingesetzt. Wie die *in vitro*-Daten zeigten, wirkte EGFP stabilisierend bzw. führte zu einer verbesserten Genexpression der Eimeriensequenzen, so dass auch *in vivo* eine erhöhte Proteinstabilität und somit eine verbesserte Immunreaktion zu erwarten war. In einem vergleichenden Experiment wurden Hühner parenteral mit den rekombinanten Antigenen SO7 und TA4 immunisiert.

Die Überprüfung des Immunisierungserfolges im zeitlichen Verlauf erfolgte über die Analyse der spezifischen Serokonversion mittels ELISA. Zusätzlich wurde versucht die zelluläre Immunreaktion mit einem T-Zelltransformationstest und anhand der Oozystenverminderung nach einer Belastungsinfektion zu ermitteln.

Im Rahmen der Immunisierung von Hühnern mit den drei Eimerien-EGFP-Fusionskonstrukten (pCDNA3) erfolgten zwei intramuskuläre Immunisierungen (100µg/Tier) im Abstand von 30 Tagen. Die Belastungsinfektion mit 30000 *E. tenella* Oozysten wurde eine Woche nach der zweiten Immunisierung appliziert (Abb. 17).

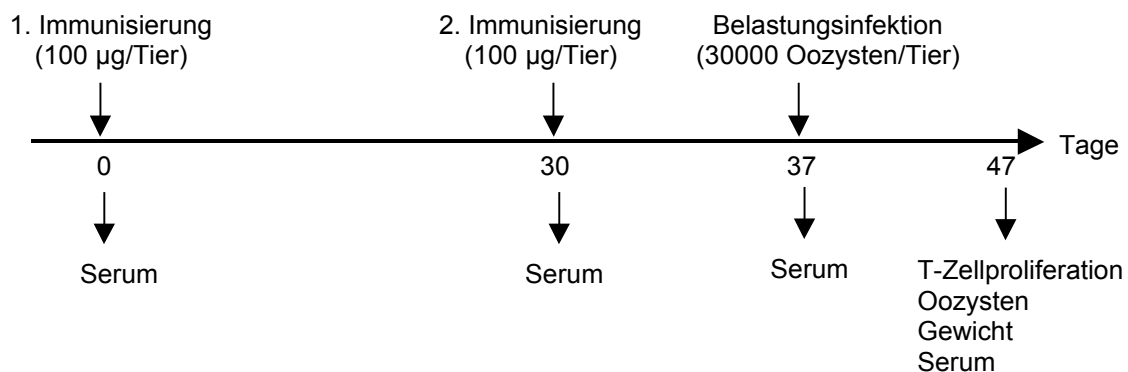


Abb. 17: Schema zur DNA-Immunisierung von Hühnern.

Um den Ablauf der Immunisierung zu verfolgen, wurde die spezifische Serokonversion mittels ELISA bestimmt. Als Antigene wurden hierzu *E. coli*-exprimierte Proteine eingesetzt. Die mit dem SO7-Konstrukt immunisierten Tiere zeigten signifikante Antikörperreaktionen ( $p \leq 0,05$ ) nach der ersten Immunisierung im Vergleich zu den EGFP-Kontrolltieren (Abb. 18). Der Antikörpertiter blieb auch

nach der zweiten Immunisierung und bis zehn Tage nach der Infektion konstant. Die mit TA4- oder EtMIC1-Fusionskonstrukt immunisierten Tiere zeigten keine signifikanten Antikörperreaktionen nach der zweiten Immunisierung. Innerhalb der ersten zehn Tage nach der Infektion erfolgte ein Anstieg des TA4- bzw. EtMIC1-Antikörpertiters (Abb. 18). Hierbei konnte jedoch kein Unterschied zwischen den immunisierten Tieren und Kontrolltieren festgestellt werden.

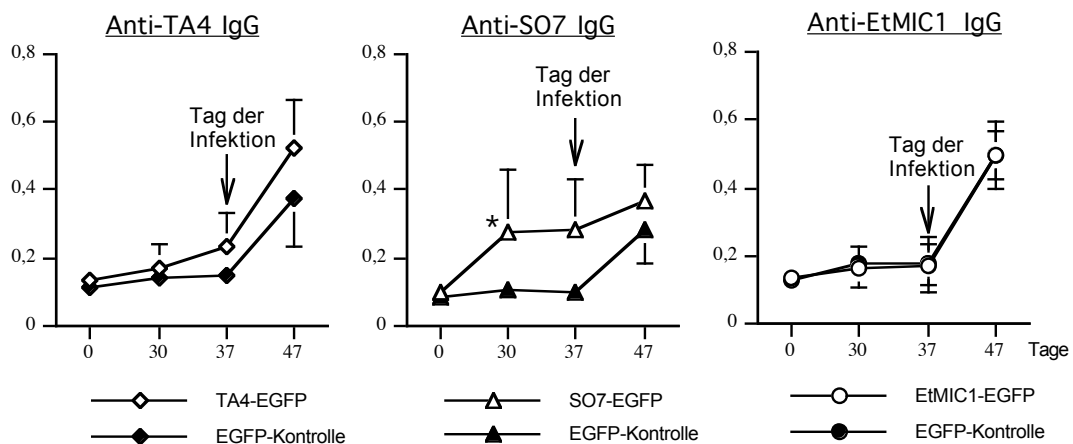


Abb. 18: Antikörperantwort von Hühnern nach DNA-Immunisierung am Tag 0 und 30.

Immunisierung mit 100µg Plasmid-DNA/Tier (pCDNA3-Konstrukte). Belastungsinfektion am Tag 37 mit 30000 Oozysten/Tier. TA4-EGFP (n=5), SO7-EGFP (n=5), EtMIC1-EGFP (n=6), EGFP-Kontrolle (n=4). ELISA (IgG) gegen rekombinantes SO7-, TA4- bzw. EtMIC1-Protein. Serumverdünnung 1:125. Signifikanzniveau zur EGFP-Kontrolle  $p \leq 0,05$  (\*).

Die Überprüfung der Antikörperreaktion gegen den Fusionspartner EGFP ergab einen stetigen Anstieg der Antikörperkonzentration in den Gruppen, die mit SO7-EGFP, TA4-EGFP und EGFP-Konstrukten immunisiert worden waren (Abb. 19). Die Versuchstiere, die mit EtMIC1-EGFP immunisiert wurden, zeigten keine Antikörperreaktion gegen EGFP. Erst nach der Infektion konnten auch bei diesen Tieren EGFP-spezifische Antikörper nachgewiesen werden. Das deutet darauf hin, dass eine Grundimmunisierung vorlag, die durch die immunologischen Reaktionen der Tiere auf die Belastungsinfektion verstärkt wurde.



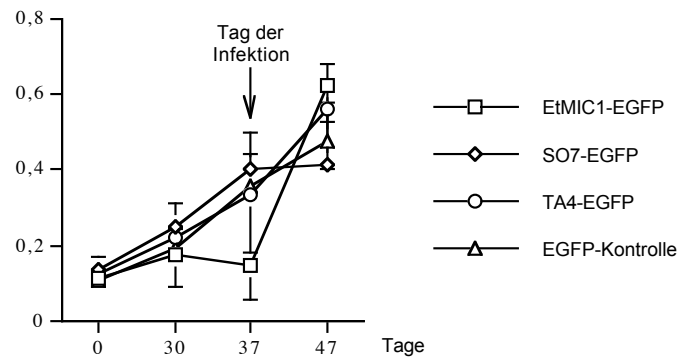


Abb. 19: EGFP-spezifische Antikörperantwort von Hühnern nach DNA-Immunisierung mit EGFP-Fusionskonstrukten am Tag 0 und 30.

Immunisierung mit 100µg Plasmid-DNA/Tier. Eingesetzt wurden pCDNA3-Konstrukte. Belastungsinfektion am Tag 37 mit 30000 Oozysten/Tier. TA4-EGFP (n=5), SO7-EGFP (n=5), EtMIC1-EGFP (n=6) und EGFP-Kontrolle (n=4). ELISA (IgG) gegen EGFP. Serumverdünnung 1:250.

Neben der humoralen Antwort wurde versucht die spezifische T-Zellantwort der peripheren Blut-Lymphozyten (PBL) über einen Lymphozytentransformationstest zu analysieren. Der Test wurde lediglich am Ende des Versuchs (10 Tage p.i.) durchgeführt, da bei jungen Hühnern nur geringe Mengen Blut entnommen werden können und in der vorliegenden Arbeit aus Kapazitätsgründen keine weiteren Versuchsgruppen mitgeführt wurden. Die PBL wurden mit den rekombinanten Eimerienantigenen und ConA stimuliert. Dabei wurde als Schwellenwert für eine positive Stimulation ein Stimulationsindex (SI) größer drei definiert.

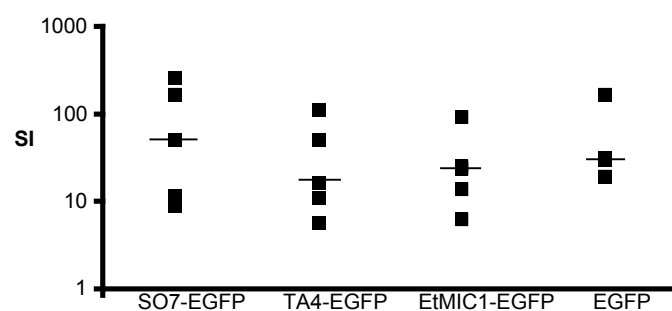


Abb. 20: Proliferation der PBL von DNA-immunisierten Hühnern nach einer *Eimeria tenella*-Belastungsinfektion und nach ConA-Stimulation.

DNA-Immunisierung am Tag 0 und 30, Belastungsinfektion mit 30000 *E. tenella*-Oozysten am Tag 37. Zellisolation am Tag 10 p.i.. Stimulation mit ConA (25 µg/ml). SI: Stimulationsindex (logarithmisch). Querstrich: Median. TA4-EGFP (n=5), SO7-EGFP (n=5), EtMIC1-EGFP (n=6), EGFP (n=4). Mediumwert (n=20): 469 ± 767 counts per minute (cpm).

Die Inkubation der Zellen mit ConA ergab eine allgemeine T-Zellreaktivität zwischen 10 und 100 SI, die zeigte, dass reaktive T-Zellen vorlagen (Abb. 20). Eine eimerienspezifische T-Zellproliferation nach Restimulation mit den rekombinanten Antigenen konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Eine verminderte Ausscheidung von Oozysten nach einer Belastungsinfektion ist ein Hinweis auf die Induktion einer schützenden Immunantwort. Wie sich jedoch aus Abbildung 21A ergibt, wurden keine Unterschiede in der Parasitenreplikation zwischen immunisierten Tieren und den Kontrolltieren gefunden.

Ein weiteres häufig genutztes Kriterium zur Feststellung des Immunschutzes, ist die Gewichtszunahme, die ein Maß für die Schwere der Pathologie und Futterverwertung nach einer Belastungsinfektion darstellt. Sie ergibt sich aus der Gewichts Differenz der Versuchstiere zum Zeitpunkt der Infektion und sieben Tage p.i.. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den immunisierten Tieren und den Kontrollen festgestellt werden (Abb. 21B).

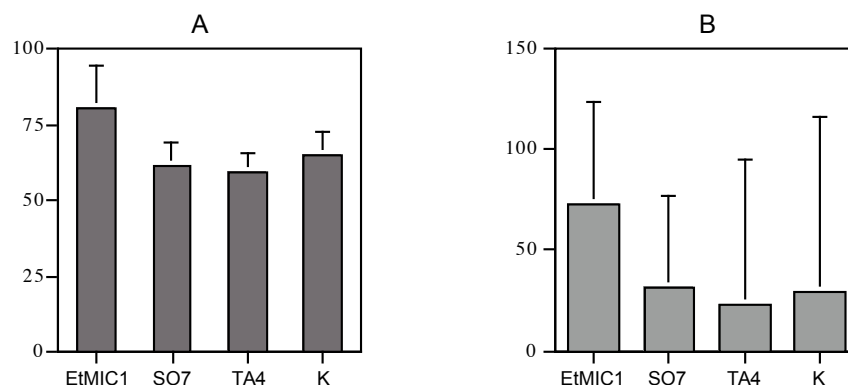


Abb. 21: Oozystenausscheidung und Gewichts Differenz von DNA-immunisierten Hühnern während der *Eimeria tenella*-Belastungsinfektion.

A: Gesamt-Oozystenausscheidung (Tag 5-10 p.i.). B: Gewichts Differenz individueller Tiere (Differenz von Tag 7 und Tag 0 p.i.). Infektionsdosis: 30000 *E. tenella*-Oozysten. Eingesetzt wurden pCDNA3-EGFP-Fusionskonstrukte: TA4 (n=5), SO7 (n=5), EtMIC1 (n=6), K = EGFP-Kontrolle (n=4).

Auffällig waren große Unterschiede innerhalb der Versuchsgruppen. Die Werte der Gewichts Differenz schwankten insgesamt zwischen -100g und +150g und dokumentierten die große Belastung durch die sehr hohe Infektionsdosis (30000 Oozysten). Da es sich bei der Rasse "weiße Leghorn" nicht um genetisch definierte Tiere handelt, kann davon ausgegangen werden, dass die unterschiedlichen

Gewichtszunahmen auch auf den unterschiedlichen genetischen Hintergrund der Tiere zurückzuführen sind.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die DNA-Immunisierung mit dem SO7-EGFP-Fusionskonstrukt eine SO7-spezifische Antikörperantwort nach der ersten und zweiten Immunisierung generierte. Im Gegensatz hierzu induzierte das TA4- und EtMIC1-EGFP-Fusionskonstrukt keine nachweisbaren Antikörperkonzentrationen. Mit Ausnahme des EtMIC1-Plasmides induzierten alle Konstrukte nach zwei DNA-Applikationen EGFP-spezifische Antikörperantworten. Nach der Belastungsinfektion mit *E. tenella* konnten bei den Tieren spezifische Antikörper gegen die Eimerienzielantigene detektiert werden. Des Weiteren war unter den genannten Bedingungen keine spezifische T-Zellproliferation nachweisbar. Auch hinsichtlich der Oozystenausscheidung nach Belastungsinfektion, die einen Parameter für den Immunschutz darstellen kann, wurden keine Unterschiede zwischen den immunisierten Tieren und Kontrolltieren festgestellt.

Die parenterale Immunisierung von Hühnern wurde mit bakteriell exprimiertem SO7- und TA4-Antigen durchgeführt. Die Proteinexpression in Bakterien und deren Aufreinigung mittels Ni-Chelat-Affinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen wurde nach einem etablierten Protokoll durchgeführt (Pogonka et al., 03).

Es erfolgten zwei subkutane Immunisierungen im Abstand von zwei Wochen mit jeweils 50 µg Protein. Für die erste Applikation wurde *Freund's complete adjuvans* (FCA) eingesetzt und für die zweite Applikation *Freund's incomplete adjuvans* (FIA). Eine Negativkontrollgruppe bekam nur Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) mit FCA bzw. FIA verabreicht. Um möglicherweise auch kleine Effekte zu erfassen, erfolgte nach zwei Wochen die Belastungsinfektion mit einer niedrigen Infektionsdosis von 500 *E. tenella*-Oozysten.

Die humorale Immunantwort gegen die Eimerienantigene SO7 und TA4 im Serum immunisierter Tiere wurde mit Hilfe des ELISA untersucht. Als Zielantigenen wurden die rekombinanten SO7- und TA4-Proteine eingesetzt. Immunisierte Tiere zeigten im Vergleich zu den Kontrolltieren bereits nach einmaliger Immunisierung eine hohe

IgG-Antikörperkonzentration gegen das jeweilige Protein (Abb. 22). Dieser Antikörpertiter blieb über die zweite Immunisierung und die Infektion hinweg beständig. Zusätzlich konnten spezifische IgA-Antikörper im Serum immunisierter Tiere festgestellt werden, die aber deutlich niedriger konzentriert waren. Dies wird anhand der eingesetzten Serumverdünnungen (1:5000 bei IgG, 1:100 bei IgA) deutlich. Auch hier zeigten die immunisierten Tiere bereits nach der ersten Immunisierung eine spezifische Reaktion, die über die zweite Immunisierung und Infektion hinweg unverändert blieb.

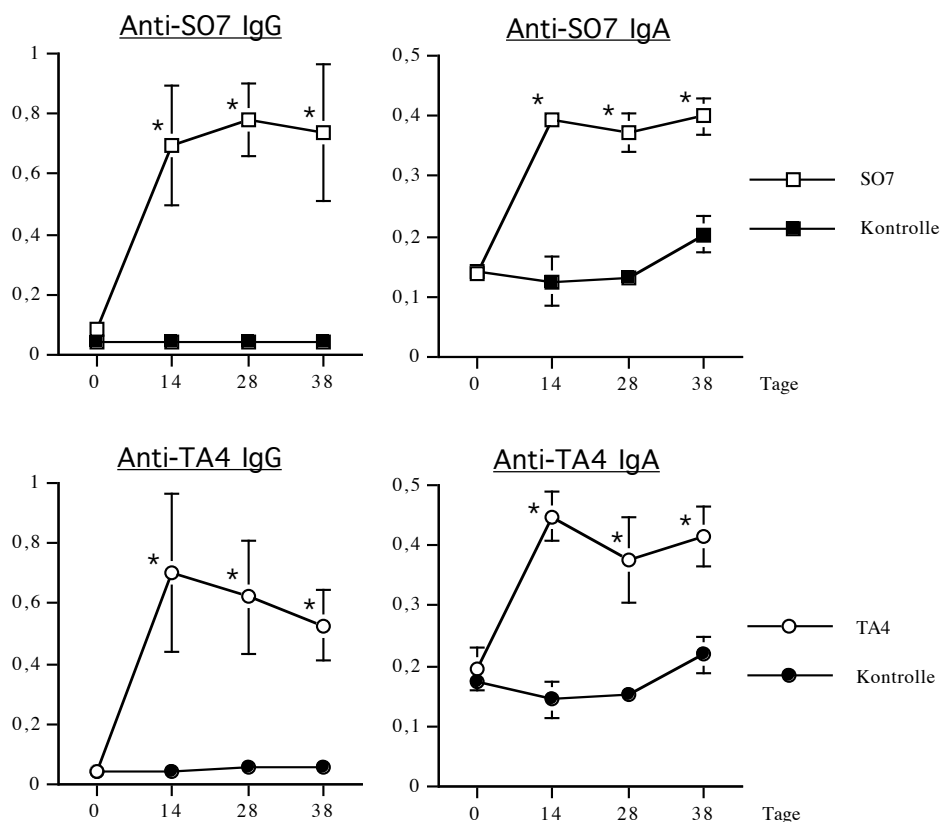


Abb. 22: Antikörperantwort von Hühnern nach parenteraler Immunisierung mit TA4- und SO7-Protein am Tag 0 und 14.

Immunisierung mit 50 µg/Tier am Tag 0 (mit FCA) und Tag 14 (mit FIA). Die Kontrollgruppe erhielt lediglich PBS und Adjuvans. Belastungsinfektion mit 500 *Eimeria tenella* Oozysten am Tag 28. ELISA gegen rekombinantes TA4- bzw. SO7-Protein. Serumverdünnung: für IgG 1:5000, für IgA 1:100. Signifikanzniveau zur PBS-Kontrolle  $p \leq 0,05$  (\*). Versuchsgruppen (n=5).

Wie an anderer Stelle bereits erläutert, wurde die Überprüfung der T-Zellproliferation immunisierter Hühner auf die Analyse der PBL nach Versuchsende beschränkt. Die PBL wurden zehn Tage nach der Belastungsinfektion entnommen und mit

rekombinantem Antigen, dem Mitogen ConA oder Sporozoitenantigen stimuliert.

Die PBL der mit TA4-Protein immunisierten Tiere zeigten im Gegensatz zur Kontrollgruppe signifikant erhöhte Proliferationswerte ( $p \leq 0,05$ ) nach Stimulation mit rekombinantem TA4-Antigen (Abb. 24). Als spezifische Proliferation wurde ein SI > 3 definiert. Dagegen zeigten die mit SO7-Protein immunisierten Tiere keine Erhöhung der Proliferation nach spezifischer Antigenstimulation (Abb. 22). Das Ergebnis deutet darauf hin, dass das TA4-Protein eine spezifische T-Zellreaktivität induzierte.

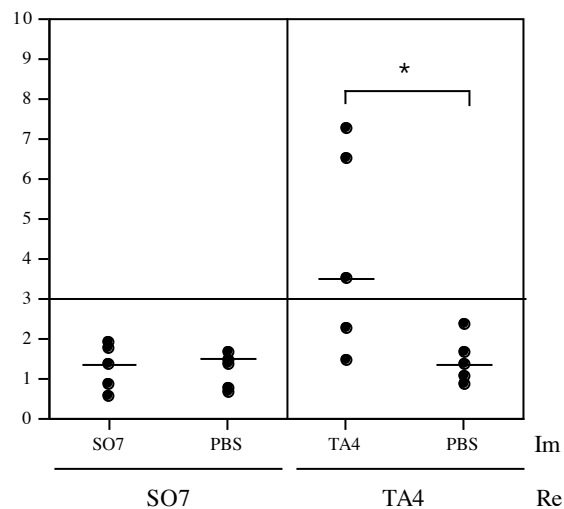


Abb. 23: Proliferation der PBL von parenteral immunisierten Hühnern nach *Eimeria tenella*-Belastungsinfektion und nach Restimulation mit SO7- bzw. TA4-Antigen.

Immunisierung mit 50 µg Protein/Tier am Tag 0 (mit FCA) und Tag 14 (mit FIA). Die Kontrollgruppe erhielt lediglich PBS und Adjuvans. Belastungsinfektion mit 500 *E. tenella* Oozysten am Tag 28. PBL-Isolation am Tag 10 p.i.. Im: Immunisierung, Re: Restimulation mit rekombinantem SO7- oder TA4-Protein (0,5 µg/Napf). Querstrich: Median. Signifikanzniveau  $p \leq 0,05$  (\*).

Die Überprüfung der allgemeinen T-Zellreaktivität der PBL durch das Mitogen ConA (15 µg/ml) zeigte, dass reaktive T-Zellen vorhanden waren. Die Werte zeigten durchschnittlich für die mit SO7-Protein immunisierte Gruppe  $30215 \pm 13325$  cpm (Mediumkontrolle:  $87 \pm 30$  cpm), für die mit TA4-Protein immunisierte Gruppe  $30276 \pm 13056$  cpm (Mediumkontrolle:  $130 \pm 78$ ) und für die mit PBS behandelte Kontrolle  $46992 \pm 15146$  cpm (Mediumkontrolle:  $72 \pm 40$ ). Die durchschnittlichen Proliferationswerte der mit SO7-Protein oder mit TA4-Protein immunisierten Tiere lagen ca. 33% niedriger als die Werte der PBS behandelten Kontrollen. Eine statistische Signifikanz konnte allerdings nicht festgestellt werden.

Die Überprüfung der T-Zellproliferation nach Stimulation durch Sporozoitenantigen sollte einen Hinweis auf den zellulären Immunstatus der Tiere nach der Belastungsinfektion geben. Die Mehrheit der infizierten Tiere zeigte (10 von 15 Tieren) erhöhte Proliferationswerte nach Antigenstimulation im Vergleich zum Kontrollansatz (Daten nicht gezeigt). Die SI-Werte lagen zwischen vier und 13 und somit über dem Schwellenwert drei, der als spezifische Proliferation definiert worden war. Diese Tiere zeigten keine Besonderheiten bezüglich der Infektion. Bei fünf Tieren konnte keine eimerienspezifische T-Zellproliferation nachgewiesen werden, obwohl reaktive T-Zellen vorlagen, wie die Proliferationswerte mit ConA gezeigt hatten. Die Ergebnisse zeigten, dass Eimerieninfektionen spezifische reaktive T-Zellen generierten, wobei die ermittelten Proliferationswerte mit früher publizierten Daten vergleichbar waren (Breed et al., 97).

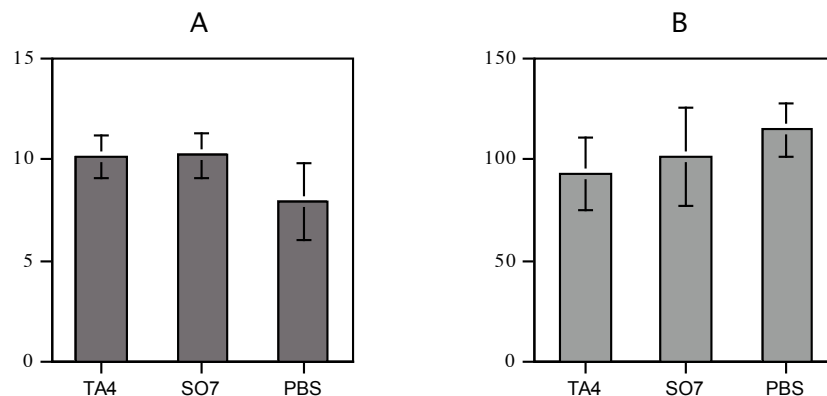


Abb. 24: Oozystenausscheidung und Gewichtsdiﬀerenz von parenteral immunisierten Hühnern während einer *Eimeria tenella*-Belastungsinfektion.

A: Gesamt-Oozystenausscheidung (Tag 5-10 p.i.). B: Gewichtsdiﬀerenz individueller Tiere (Diﬀerenz von Tag 7 und Tag 0 p.i.). Immunisierung mit 50 µg Protein/Huhn am Tag 0 (mit FCA) und 14 (mit FIA). Infektion mit 500 *E. tenella*-Oozysten am Tag 28. TA4 (n=5). SO7 (n=5). PBS (n=5).

Als Maßstab für eine schützende Immunreaktion kann die Oozystenausscheidung dienen. Diese ergab jedoch im vorliegenden Experiment keine Unterschiede zwischen den immunisierten Tieren und der Kontrolle (Abb. 24A). Die Anzahl der ausgeschiedenen Oozysten waren bei den immunisierten Tieren mit  $10,1 \pm 1 \times 10^6$  (TA4) bzw.  $10,2 \pm 1,1 \times 10^6$  (SO7) etwas höher als die der Kontrollgruppe ( $7,9 \pm 1,9 \times 10^6$ ), wobei es sich jedoch vermutlich nur um einen zufälligen Unterschied handelte. Aus haltungstechnischen Gründen wurden die Hühner gruppenweise in einem Käfig

gehalten, so dass die Oozystenanzahl von zusammengeführtem Fäzes ermittelt wurde. Die hieraus gewonnenen Ergebnisse können daher lediglich als Orientierung dienen.

Die Analyse der Gewichtszunahme nach Belastungsinfektion ergab keine deutlichen Unterschiede zwischen immunisierten Tieren und den Kontrolltieren. Im Durchschnitt zeigten die mit TA4- oder SO7-Protein immunisierten Tiere eine Gewichtszunahme um  $93 \pm 18$  g bzw.  $101 \pm 24$  g und die Kontrollgruppe um  $114 \pm 13$  g (Abb. 24B).

Abschließend kann festgestellt werden, dass die parenterale Immunisierung mit den rekombinanten Antigenen SO7 und TA4 mit Freund's Adjuvans schon nach der ersten Immunisierung einen hohen Antikörpertiter generierte, der über die zweite Immunisierung und Belastungsinfektion hinweg beständig blieb. Die Analyse der T-Zellproliferation führte zu dem Ergebnis, dass die PBL von Tieren, die mit TA4-Protein immunisiert wurden, mit dem rekombinanten TA4-Antigen zur Proliferation angeregt werden konnten. Im Gegensatz dazu konnte bei den mit SO7-Protein immunisierten Tieren und den mit PBS behandelten Kontrolltieren keine T-Zellproliferation nach Stimulation mit rekombinanten Antigenen detektiert werden. Die Immunisierung hatte jedoch keinen Einfluss auf die Oozystenauscheidung und Gewichtsdivergenz nach der *E. tenella*-Belastungsinfektion.

### **2.2.3 Einfluss des Vektortypes, des Fusionspartners EGFP und koexprimierter Zytokine auf den Immunisierungserfolg mit SO7-DNA-Vakzinen**

In dem vorliegenden Experiment sollten weitere Parameter des DNA-Immunisierungsschemas analysiert werden. Dies umfasste sowohl den Einsatz der beiden Vektoren pCDNA3 und pVR1012, als auch die Konstrukte mit und ohne EGFP-Fusion. Im Rahmen dieser Arbeit konnten nicht alle generierten Eimerienkonstrukte eingesetzt werden, so dass die Versuche auf die SO7-Plasmide beschränkt wurden. Für das SO7-Konstrukt sprachen die Resultate des vorangegangenen DNA-Immunisierungsexperimentes, in dem nur das SO7-Plasmid eine stabile antigenspezifische Immunreaktion induzierte. Der Immunisierungserfolg wurde anhand der SO7-spezifischen Serokonversion ermittelt. Obwohl die Antikörperantwort nicht mit dem Immunschutz gegen Eimerieninfektionen korreliert, kann darüber ermittelt werden, ob eine spezifische Immunreaktion nach DNA-

Immunisierung erfolgte und gibt somit indirekt Aufschluss über die Proteinexpression *in vivo*. Zusätzlich ist bei dem Nachweis einer Antikörperantwort davon auszugehen, dass auch zelluläre Immunreaktionen induziert wurden (Gurunathan et al., 00).

Des Weiteren wurde als Parameter für die schützende Immunantwort die Oozystenausscheidung nach Belastungsinfektion mit 500 *E. tenella*-Oozysten überprüft.

In zusätzlichen Versuchsgruppen wurden die inflammatorischen Zytokinplasmide chIFN- $\gamma$ -pCDNA3 oder chIL-18-pVR1012 eingesetzt, womit der Einfluss der Koimmunisierung auf die immunologischen Parameter analysiert werden sollte.

Im vorherigen Versuch wurden zwei DNA-Applikationen mit EGFP-Fusionsplasmiden durchgeführt. Dabei ergab die Messung der Antikörperkonzentrationen gegen den Fusionspartner EGFP, dass der Antikörpertiter anstieg (siehe 2.2.2). Um zu testen, ob sich durch eine weitere Immunisierung der Antikörpertiter nochmals steigern lässt, wurden Hühner in einem Vorversuch dreimal mit 100  $\mu$ g EGFP-pCDNA3 im Abstand von zwei Wochen immunisiert und die Antikörperreaktionen verfolgt. Das EGFP-Plasmid diente dabei als Modell für die DNA-Immunisierung.

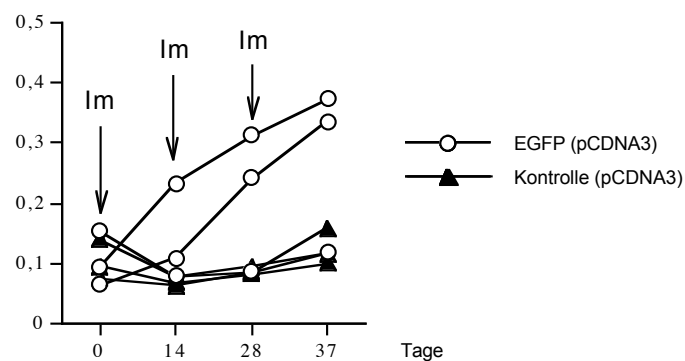


Abb. 25: EGFP-spezifische Antikörperantwort nach DNA-Immunisierung von Hühnern mit dem Modellplasmid EGFP-pCDNA3.

Im: Immunisierung (100 $\mu$ g DNA) am Tag 0, 14 und 28. ELISA gegen EGFP. Serumverdünnung 1:250.

Wie in Abbildung 25 zu erkennen ist, konnte tatsächlich ein weiterer Anstieg der Antikörperkonzentration nach der dritten Immunisierung erzielt werden. Zwei Tiere zeigten nach der dritten Immunisierung im ELISA einen klaren Anstieg der EGFP-spezifischen Antikörper. Bei einem immunisierten Huhn konnten keine EGFP-



Antikörper detektiert werden.

Für die nachfolgenden Experimente mit SO7-Konstrukten wurde dieses Immunisierungsschema übernommen und Hühner im Alter von drei Wochen drei Mal im Abstand von zwei Wochen mit 100µg Plasmid-DNA intramuskulär immunisiert. In zwei Versuchen wurden die pCDNA3- bzw. pVR1012-Konstrukte mit dem fusionslosen SO7 und dem SO7-EGFP-Fusionskonstrukt eingesetzt. Zur Ermittlung der SO7-spezifischen Antikörperantwort nach DNA-Immunisierung wurden ELISA durchgeführt und die Antikörpertiter ermittelt (Abb. 26).

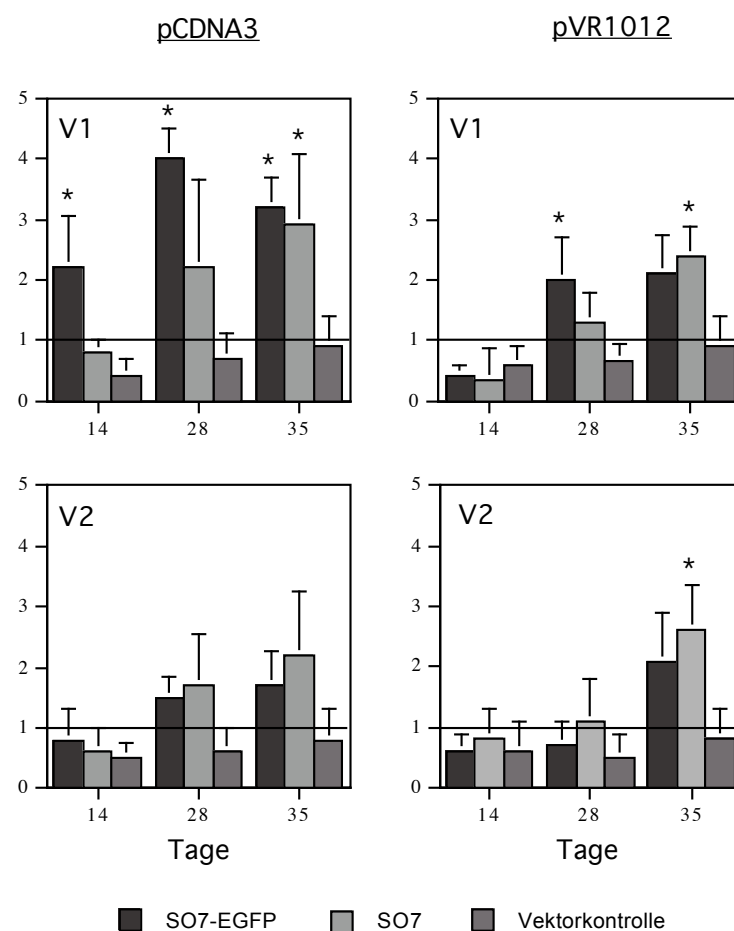


Abb. 26: SO7-spezifischer Antikörpertiter von Hühnern nach DNA-Immunisierung am Tag 0, 14 und 28.

Dargestellt sind die Antikörpertiter von Tag 14 (14 d nach 1. Immunisierung), Tag 28 (14 d nach 2. Immunisierung) und Tag 35 (7 d nach 3. Immunisierung). DNA-Immunisierung/Tier mit 100 µg Plasmid. V1: Versuch 1, V2: Versuch 2. Signifikanzniveau zur Vektorkontrolle  $p \leq 0,05$  (\*). ELISA (IgG) gegen rekombinantes SO7-Protein. Versuchsgruppen (n=5).

In jedem Experiment konnten spezifische SO7-Antikörper nachgewiesen werden, es ergaben sich aber zum Teil Unterschiede in der Intensität und dem Zeitpunkt der Antikörperreaktion. So zeigte z.B. die mit dem SO7-EGFP-Konstrukt immunisierte Gruppe im ersten pCDNA3-Versuch bereits nach der ersten Immunisierung eine signifikante Antikörperreaktion (Titer  $220 \pm 85$ ). Im zweiten Versuch hingegen konnten erst nach der zweiten Immunisierung Antikörper (Titer  $150 \pm 35$ ) detektiert werden. Dabei handelte es sich um einen deutlichen, nicht aber signifikanten Unterschied. Anders die mit SO7-Konstrukt immunisierten Gruppen beider pCDNA3-Versuche; sie zeigten die ersten deutlichen Antikörperreaktion nach der zweiten Immunisierung (Titer  $220 \pm 135$  und  $170 \pm 85$ ). Betrachtet man die pVR1012-Versuche, so kann festgestellt werden, dass im ersten Experiment nach der zweiten Immunisierung Antikörper im Serum der mit dem SO7- bzw. dem SO7-EGFP-Konstrukt immunisierten Tiere (Titer  $200 \pm 69$  und  $130 \pm 47$ ) vorhanden waren. Im zweiten Experiment ergab sich jedoch erst nach der dritten Immunisierung ein Antikörpertiter für beide Gruppen von  $260 \pm 77$  (SO7) und  $210 \pm 87$  (SO7-EGFP) (Abb. 27). Ein Vergleich der Experimente hinsichtlich der eingesetzten Vektoren pCDNA3 und pVR1012 ergab keine auffälligen Unterschiede bezüglich der Induktion der Antikörperantworten.

Einer Versuchstiergruppe wurde zusätzlich zum SO7-Fusionsplasmid das Konstrukt chIFN- $\gamma$ -pVR1012 als Kostimulans appliziert. Dabei zeigte die Antikörperantwort keine wesentlichen Unterschiede in der Serumkonzentration nach der dritten Immunisierung (Abb. 27).

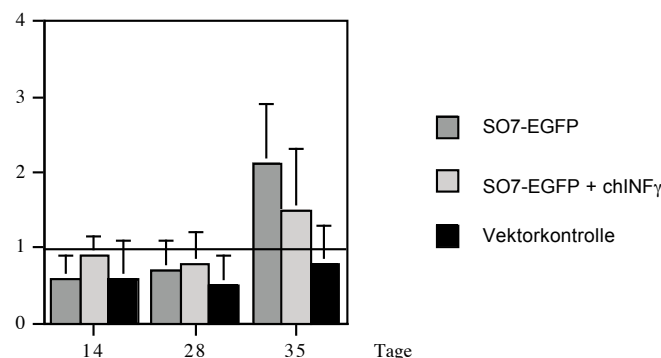


Abb. 27: SO7-Antikörpertiter von Hühnern nach DNA-Immunisierung am Tag 0, 14 und 28 mit SO7-Fusionskonstrukt und chIFN- $\gamma$ -Plasmid.

100  $\mu$ g SO7-EGFP-pVR1012  $\pm$  50  $\mu$ g chIFN- $\gamma$ -pVR1012 (n=5). Antikörpertiter von Tag 14 (14 d nach 1. Immunisierung), Tag 28 (14 d nach 2. Immunisierung) und Tag 35 (7 d nach 3. Immunisierung).

Neben chIFN- $\gamma$  wurde auch chIL-18 auf seine kostimulierende Wirkung überprüft. Es wurden je Immunisierung zusätzlich 50  $\mu$ g chIL-18-pCDNA3 eingesetzt. Jedoch konnten auch hier keine signifikanten Unterschiede in der Antikörperkonzentration festgestellt werden (Abb. 28). In dem vorliegenden Experiment konnten 14 Tage nach der ersten Immunisierung keine SO7-Antikörper detektiert werden. Nach der zweiten und dritten Behandlung zeigten die mit SO7-Konstrukten immunisierten Tiere deutliche Antikörpertiter von 150 bis 250.

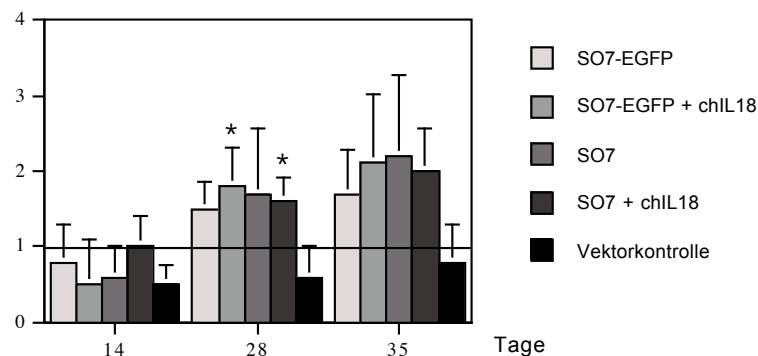


Abb. 28: SO7-Antikörpertiter von Hühnern nach DNA-Immunisierung am Tag 0, 14 und 28 mit SO7-pCDNA3-Konstrukten und chIL-18-pCDNA3.

Immunisierung: Am Tag 0, 14 und 28 (100  $\mu$ g DNA/Tier  $\pm$  50  $\mu$ g chIL-18-pCDNA3). Dargestellt sind die Antikörpertiter von Tag 14 (14 d nach 1. Immunisierung), Tag 28 (14 d nach 2. Immunisierung) und Tag 35 (7 d nach 3. Immunisierung). Signifikanzniveau zur Vektorkontrolle  $p \leq 0,05$  (\*). Gruppen (n=5).

Die Wirkung der beiden Zytokine chIFN- $\gamma$  und chIL-18 besteht hauptsächlich in der Aktivierung von Makrophagen bzw. T-Zellen und führt letztendlich zur Ausbildung einer TH1-Immunreaktion (Gobel et al., 03; Sugawara, 00). Daher wurde vermutet, dass die Koimmunisierung mit diesen Zytokinen zu einer reduzierten Antikörperkonzentration führen könnte. Die Experimente zeigten jedoch, dass unter den gegebenen Bedingungen die zusätzliche Gabe von chIL-18 oder chIFN- $\gamma$  keinen Einfluss auf die Ausbildung SO7-spezifischer Antikörper hatte.

Um beurteilen zu können, ob die SO7-DNA-Immunisierung mit den unterschiedlichen Vektoren bzw. mit oder ohne EGFP-Fusion einen veränderten Immunschutz hervorrufen kann, wurden die Versuchstiere einer Belastungsinfektion unterzogen. Als Schutzparameter wurde die Oozystenauscheidung und die Gewichtsdivergenz nach einer moderaten Belastungsinfektion mit 500 *E. tenella*-Oozysten analysiert.

Hinsichtlich der Oozystenauscheidung konnten keine Unterschiede zwischen den mit SO7-Konstrukten immunisierten Hühnern und den entsprechenden Kontrollen festgestellt werden (Tab. 7). Jedoch wurden in den ersten Versuchen große Unterschiede zwischen den mit EGFP-Plasmiden behandelten Gruppen, d.h. SO7-EGFP- und EGFP-Konstrukte, zu den Tieren die lediglich SO7-Konstrukt oder Vektor ohne Insert erhielten, festgestellt. Hierbei betrug die Oozystenauscheidung der mit EGFP-Plasmiden immunisierten Tiere das Drei- bis Fünffache der Gruppen, die mit Plasmiden ohne EGFP immunisiert wurden. Diese Resultate konnten jedoch in den nachfolgenden Experimenten nicht bestätigt werden (Tab. 7). Die Resultate der Oozystenauscheidungen können lediglich als Orientierung dienen, da sie aus dem Gesamt-Fäzes der Versuchsgruppen bestimmt wurden. Aus diesem Grund konnte keine statistische Auswertung vorgenommen werden.

Bakterielle CpG-Sequenzen, wie sie in Plasmid-DNA zu finden sind, besitzen immunstimulierende Eigenschaften und können die Immunreaktion verändern. Deshalb wurde zusätzlich eine Versuchstiergruppe, die lediglich mit PBS behandelt wurde, mitgeführt und der Einfluss der eingesetzten Vektoren auf die *E. tenella*-Infektion überprüft. Wie in Tabelle 7 ersichtlich, zeigte sich bei den verschiedenen pVR1012-Konstrukten eine Reduktion der Oozystenauscheidung zwischen 26% und 52 % im Vergleich zu PBS-behandelten Tieren. Hingegen wurden solche Unterschiede bei den pCDNA3-Plasmiden nicht beobachtet. Ob es sich bei den aufgezeigten Unterschieden tatsächlich um Vektor-bedingte Einflüsse handelte, müsste jedoch in zusätzlichen Studien überprüft werden.

Tab. 7: Oozystenauscheidung von DNA-immunisierten Hühnern während der *Eimeria tenella*-Belastungsinfektion.

Oozysten x 10 <sup>6</sup> /Tier	SO7-GFP	GFP-Kontrolle	SO7	Vektorkontrolle	PBS-Kontrolle
<b>pVR1012 Versuch 1</b>	16,5 ± 4,86	23 ± 3,2	6,1 ± 1,6	5,1 ± 0,8	-
<b>pVR1012 Versuch 2 (+50 µg IFN-γ-pVR1012)</b>	10,5 ± 1,9 (14,0 ± 2,5)	9,6 ± 2,0 -	14,6 ± 2,0 -	12,6 ± 2,4 -	19,9 ± 3,7 -
<b>pCDNA3 Versuch 1</b>	6,2 ± 1,3	7,1 ± 0,8	2,1 ± 1,2	1,5 ± 0,4	-
<b>pCDNA3 Versuch 2 (+50 µg IL-18-pCDNA3)</b>	5,3 ± 0,8 (4,2 ± 0,4)	4,1 ± 0,5 -	3,7 ± 0,5 (3,6 ± 0,7)	3,9 ± 0,5 -	3,2 ± 0,8 (4,2 ± 0,7)

Oozystenauscheidung von Tag 5 - Tag 10 p.i. (n=5). Belastungsinfektion mit 500 *E. tenella*-Oozysten

Die Analyse der Gewichts­differenz der immunisierten Tiere im Vergleich zu den PBS- oder Vektorkontrollen ergab keine auffälligen Unterschiede (Tab. 8). Die prozentuale Gewichtszunahme der einzelnen Gruppen betrug sieben Tage nach der Infektion zwischen 13 % bis 18 % des Gewichtes der Tiere am Infektionstag.

Tab. 8: Gewichts­analyse von DNA-immunisierten Hühnern während der *Eimeria tenella*-Belastungsinfektion.

<b>ΔGewicht (%) (Ø Gewicht am Infektionstag [g])</b>	<b>SO7-GFP</b>	<b>GFP- Kontrolle</b>	<b>SO7</b>	<b>Vektor- kontrolle</b>	<b>PBS- Kontrolle</b>
<b>pVR1012 Versuch 1</b>	15,9 ± 1,2 (783 ± 97,9)	16,9 ± 2,3 (829 ± 95,4)	18,9 ± 2,3 (838 ± 135,2)	17,9 ± 4,1 (831,4 ± 63,7)	-
<b>pVR1012 Versuch 2</b>	14,1 ± 6,0 (737 ± 50,7)	14,0 ± 5,9 (825 ± 154,8)	15,2 ± 4,6 (832 ± 42)	17,5 ± 0,5 (795 ± 91,3)	18,4 ± 5,4 (899 ± 87,2)
<b>(+50 µg IFN-γ-pVR1012)</b>	20,4 ± 4,5 (826 ± 77,6)	-	-	-	-
<b>pCDNA3 Versuch 1</b>	16,6 ± 4,8 (831 ± 59,8)	15,0 ± 5,5 (834 ± 47,6)	16,5 ± 6,5 (847 ± 100,1)	15,3 ± 3,1 (810 ± 62,7)	-
<b>pCDNA3 Versuch 2</b>	13,8 ± 4,6 (705 ± 67)	17,1 ± 4,8 (635 ± 84,4)	15,7 ± 1,7 (644 ± 44,6)	16,1 ± 4,9 (639 ± 90,6)	12,6 ± 2,6 (667 ± 42,5)
<b>(+50 µg IL-18-pCDNA3)</b>	14,1 ± 1,8 (635 ± 87)	-	13,2 ± 1,5 (628,8 ± 77,8)	-	12,8 ± 2,9 (630 ± 36,1)

ΔGewicht (%): prozentuale Gewichtszunahme der Hühner am Tag 7 nach einer Belastungsinfektion mit 500 *E. tenella*-Oozysten. Versuchsgruppen (n=5).

Die Experimente konnten zeigen, dass durch die Immunisierung mit den unterschiedlichen SO7-Konstrukten spezifische SO7-Antikörperantworten generiert wurden. Hinsichtlich der eingesetzten Vektoren und des EGFP-Fusionsanteils konnten keine eindeutigen Unterschiede in der Induktion der humoralen Immunantwort beobachtet werden. Die Oozystenausscheidung oder Gewichts­differenz nach *E. tenella*-Belastungsinfektion zeigte keine Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen.

### 2.3 DNA-Immunisierungsstudien mit neu-identifizierten, sekretorischen *E. tenella*-Antigenen bei Hühnern

Um zu überprüfen, ob die hier identifizierten sekretorischen Eimerienproteine einen Immunschutz induzieren können, wurden sie in Immunisierungsexperimenten eingesetzt. Dabei konnte aus Kapazitätsgründen nur ein Teil der identifizierten

Sequenzen als DNA-Impfstoff getestet werden.

Die Sequenzinformationen der 25 experimentell im Hefesystem identifizierten Sequenzen umfassten trotz des Abgleichs mit der *E. tenella*-EST-Bank nicht immer einen kompletten ORF. Deshalb wurden zur Generierung der DNA-Immunisierungskonstrukte 13 Sequenzen ausgewählt, die einen ORF mit Start- und Stop-Kodon aufwiesen. Neben den Sequenzen H3, H4, H14, H15, H35 und H36, deren abgeleitete Aminosäuresequenzen keine Homologie zu bekannten Proteinsequenzen zeigten, wurden die Sequenzen H1, H7, H9, H11, H13, H24 und H28 zur Klonierung ausgewählt. Diese Sequenzen zeigten Homologien zu schon bekannten Proteinen, sind aber bei *E. tenella* mit Ausnahme von H11 bisher nicht als Proteinsequenzen beschrieben worden (siehe Abschnitt 2.1.2.3). H11 wurde kürzlich in SAG10 (EMBL: Q70CC2) in der Proteindatenbank umbenannt (Tabares et al., 04). Es handelt sich um ein TA4-ähnliches Molekül, das mit anderen verwandten Proteinen auf der Parasitenoberfläche zu finden ist. TA4 wurde als Hauptoberflächenprotein von *E. tenella*-Sporozoiten identifiziert (Brothers et al., 88).

Die DNA-Immunisierung fand nach dem Schema statt, das in den vorherigen Versuchen erarbeitet worden war. Im Gegensatz zu pVR1012 wurde pCDNA3 schon häufig zur DNA-Immunisierung bei Hühnern eingesetzt. Beispielsweise führte die Applikation der Sequenz Ea3-1E wiederholt zu einer Reduktion der Parasitenlast nach Belastungsinfektionen mit *E. acervulina* (Lillehoj et al., 00; Song et al., 00). Da in den vorliegenden Untersuchungen keine wesentliche Unterschiede bezüglich der Proteinexpression oder Immunreaktion festzustellen war, wurde zur Klonierung der ausgewählten Sequenzen auf pCDNA3 zurückgegriffen.

#### 2.3.1.1 Klonierung und Überprüfung der ausgewählten sekretorischen Eimeriensequenzen im eukaryotischen Expressionsvektor pCDNA3

Zur Klonierung der oben genannten Sequenzen wurde eine RT-PCR mit Sporozoiten-Gesamt-RNA durchgeführt, wobei der Bereich der Signalsequenz nicht berücksichtigt wurde. Wie aus Abbildung 29 hervorgeht, konnten die spezifischen Transkripte mittels RT-PCR amplifiziert werden. Im Agarosegel wurden jedoch mitunter noch zusätzliche unspezifische Banden detektiert. Die Banden, die der erwarteten Größe (siehe Tab. 9) entsprachen, wurden aus dem Gel eluiert und in den T-Überhangsvektor pGEM-T (Promega, Heidelberg) kloniert.

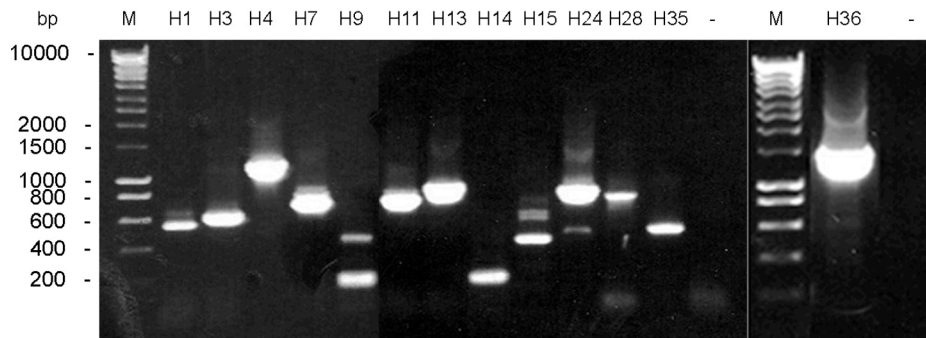


Abb. 29: Agarose-Gelelektrophorese der mittels RT-PCR isolierten *Eimeria tenella*-cDNA's.

RT-PCR-Ansätze (H1 bis H36) im 0,8-%igen Agarosegel aufgetrennt. M: DNA-Marker. Negativkontrolle (-).

Tab. 9: Erwartete PCR-Produkte und theoretisches Molekulargewicht der abgeleiteten *Eimeria tenella*-Proteine.

	H1	H3	H4	H7	H9	H11	H13	H14	H15	H24	H28	H35	H36
NS (bp)	550	607	1168	715	174	736	865	184	404	817	745	466	1264
MW (kDa)	19,6	21,7	43,2	24,5	5,6	25,3	31	6,3	14,6	30	26,9	16,4	44,9

NS: Nukleinsäuresequenz in Basenpaaren (bp) ohne Signalsequenz. MW: Molekulargewicht in kDa der abgeleiteten Proteine.

Um die Sequenzen zu verifizieren wurde eine DNA-Sequenzierung durchgeführt. Sie zeigte, dass alle klonierten Fragmente den erwarteten Sequenzen entsprachen.

Für die unbekannten Eimeriensequenzen liegen derzeit keine rekombinanten Proteine vor, so dass keine spezifische Antikörperantwort detektiert werden kann. Um dennoch den Immunisierungserfolg in Hühnern überprüfen zu können, wurde der Zielvektor pCDNA3 im 5'-Bereich der Klonierungsstelle durch Oligonukleotidinsertion mit einem myc-Epitop versehen. Es handelt sich dabei um ein kurzes, zehn Aminosäuren umfassendes, lineares B-Zellepitop für das kommerzielle monoklonale Antikörper verfügbar sind. Zusätzlich wurde damit eine spezifische Proteindetektion in Zellextrakten von COS-7-Zellen ermöglicht.

Zur Amplifikation der 13 Eimeriensequenzen wurden jeweils Primer verwendet, die mit zwei unterschiedlichen Restriktionsschnittstellen versehen waren, so dass die Fragmente zielgerichtet in pCDNA3myc umkloniert werden konnten. Aufgrund unterschiedlicher Restriktionsschnittstellen in den Eimeriensequenzen mussten

teilweise verschiedene Enzymkombinationen gewählt werden. Die Sequenzen H9, H11 und H13 wurden mit BamHI/XhoI, die Sequenz H15 mit HindIII/NotI und die restlichen Sequenzen (H1, H3, H4, H7, H14, H24, H28, H35, H36) mit HindIII/XhoI aus pGEM-T ausgeschnitten und in den entsprechend vorbereiteten pCDNA3myc-Vektor ligiert. Zur Überprüfung des Klonierungserfolges wurden Restriktionsanalysen durchgeführt, die zeigten, dass die erwarteten Fragmentgrößen kloniert wurden (Daten nicht gezeigt).

Um die Genexpression zu kontrollieren wurden COS-7-Zellen mit den DNA-Immunisierungsvektoren transfiziert und die Zellextrakte im Immunblot analysiert. Zur Detektion wurde ein kommerzieller anti-myc-Antikörper (Invitrogen, Karlsruhe) eingesetzt. Es zeigte sich, dass bei sieben Konstrukten entsprechende Banden im Immunblot detektiert werden konnten (Vergleiche Tab. 9 und Abb. 30). Bei sechs Konstrukten konnte keine Expression nachgewiesen werden. Vermutlich lag hier die Proteinexpression unter der Nachweisgrenze. Die genaue Analyse der Signale bei den Konstrukten H3, H7 und EGFP-Kontrolle zeigte zwei dicht nebeneinander liegende Signale, die sich etwa auf der Höhe der erwarteten Molekulargewichte befanden. H4 zeigte zwei Signale bei ca. 23 und 30 kDa, wobei hier ein Signal bei 43 kDa erwartet wurde. Es könnte sich um eine Fragmentierung des Proteins handeln. Bei den übrigen Sequenzen wurden einzelne Banden detektiert, wobei das apparente Molekulargewicht bei H7 und H11 etwa dem erwarteten von 24 kDa bzw. 25 kDa entsprach. Hingegen zeigten die Proteinbanden von H13 (27 statt 31 kDa), H28 (23 statt 27 kDa) und H36 (30 statt 45 kDa) niedrigere Molekulargewichte als erwartet (Vergleiche Abb. 30 und Tab. 11).

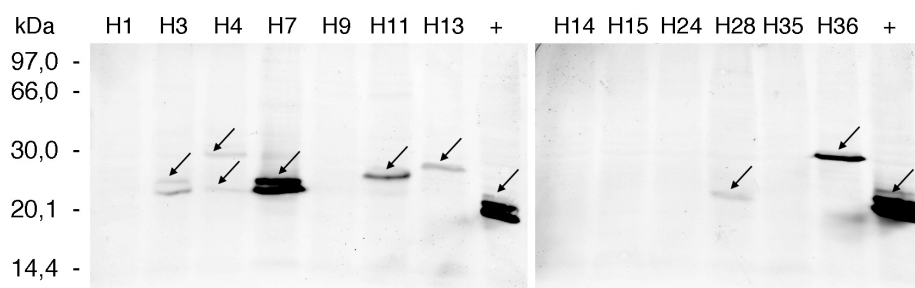


Abb. 30: Immunblotanalyse der pCDNA3myc-Konstrukte in COS-7-Zellen mit anti-myc-Antikörper.

COS-7-Zellen (Extrakt aus  $5 \times 10^4$  Zellen/Spur) transfiziert mit Immunisierungsvektoren (H1 bis H36). Anti-myc-Antikörper (1:5000). Positivkontrolle: EGFP-pCDNA3myc (+). Pfeile: detektierte Signale



### 2.3.1.2 DNA Immunisierung von Hühnern mit den generierten *Eimeria*-cDNA-Konstrukten

Die 13 generierten DNA-Konstrukte wurden in einem Immunisierungsexperiment eingesetzt. Es erfolgten nach dem etablierten Immunisierungsschema (Abb. 31) drei Immunisierungen im Abstand von zwei Wochen mit je 100 µg DNA/Tier. Die Belastungsinfektion mit 500 *E. tenella*-Oozysten erfolgte eine Woche nach der dritten Immunisierung.

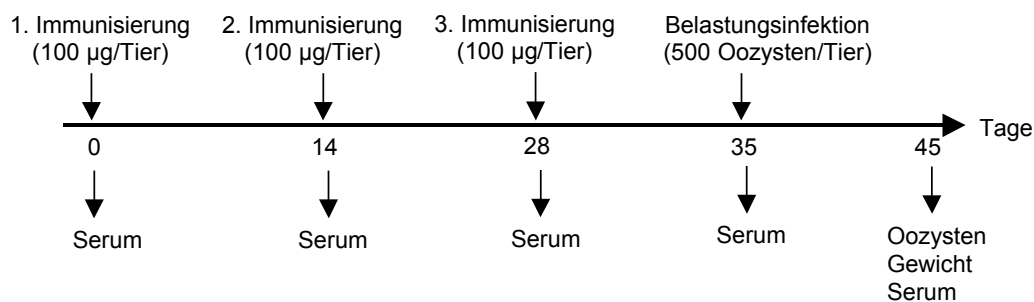


Abb. 31: Schema zur DNA-Immunisierung von Hühnern.

Es wurden zwei Negativkontrollen (PBS- bzw. Vektorkontrolle), sowie eine Positivkontrolle mitgeführt. Die Tiere der Positivkontrolle wurden im Alter von drei Wochen mit jeweils 500 *E. tenella*-Oozysten infiziert, was schließlich zur natürlichen Immunität führte.

Um den Immunisierungserfolg zu überprüfen, wurden die Seren der Versuchstiere im ELISA analysiert. Da zum Zeitpunkt der Arbeiten noch keine aufgereinigten rekombinanten Proteine vorlagen, wurden die Seren auf anti-myc-Antikörper hin analysiert. Hierzu wurden synthetisch hergestellte myc-Peptide (Dr. Volkmer-Engert, Medizinische Immunologie, Charite Berlin) an bovines Serumalbumin (BSA) gekoppelt. Die ELISA-Analyse der zu unterschiedlichen Zeitpunkten gewonnenen Seren (1:100 verdünnt) ergab, dass in keinem Fall spezifische anti-myc-Antikörper nachweisbar waren (Daten nicht gezeigt).

Die Analyse der Oozystenausscheidung ergab in dem Experiment eine deutliche Reduktion bei den Konstrukten H7 (- 48%) und H15 (- 29%) im Vergleich zu den Negativkontrollen (Abb. 32). Auch die Positivkontrolle zeigte eine drastische

Verringerung der Oozystenausscheidung um 93%. Bei vier Gruppen wurde eine Erhöhung der Oozystenausscheidung festgestellt. Wie schon ausgeführt, wurde der Fäzes einzelner Gruppen als Pool untersucht, so dass die Daten lediglich einen orientierenden Hinweis geben können. In einem weiteren Immunisierungsexperiment, das im Rahmen einer Diplomarbeit durchgeführt wurde (Gehre, 04), konnten die Resultate mit Ausnahme der Positivkontrolle nicht reproduziert werden. Es ist daher davon auszugehen, dass die gefundenen Unterschiede in der Oozystenausscheidung auf zufälligen Schwankungen beruhen.

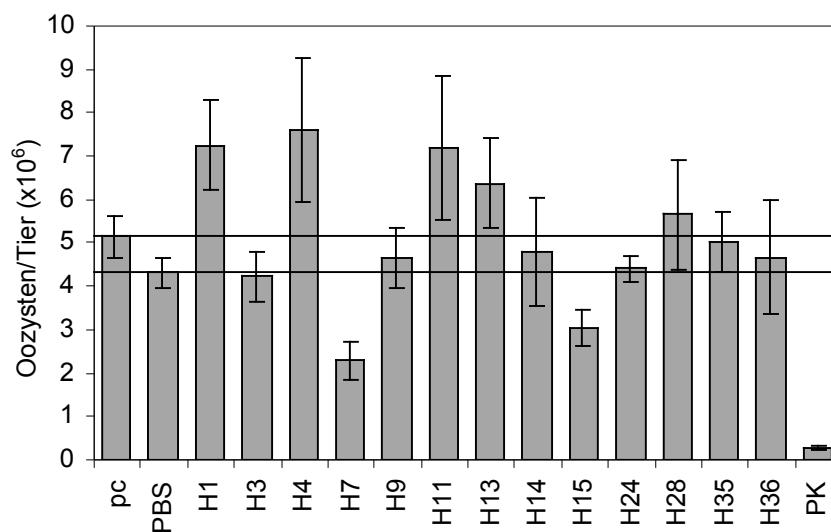


Abb. 32: Oozystenausscheidung von DNA-immunisierten Hühnern während der *Eimeria tenella*-Belastungsinfektion.

Gesamt-Oozystenausscheidung/Tier (Tag 5-10 p.i.). H1 bis H36: verschiedene pCDNA3myc-Konstrukte. pc: Vektorkontrolle (pCDNA3myc). PBS: Tiere, die lediglich PBS erhielten. PK: Positivkontrolle (Hühner nach überwundener *E. tenella*-Erstinfektion). Versuchsgruppen (n=5).

Hinsichtlich der Gewichtsdivergenz der Hühner konnten keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen festgestellt werden (Abb. 33). Auch die Positivkontrolle, und damit Hühner, die eine natürliche Immunität nach Erstinfektion besaßen, zeigten keine effizientere Gewichtszunahme während der Belastungsinfektion im Vergleich zu den anderen Gruppen. Aufgrund dieser Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass die relativ geringe Infektionsdosis von 500 Oozysten nicht ausreichte, um Unterschiede in der Gewichtsentwicklung zwischen geschützten und nicht-geschützten Tieren beobachten zu können.

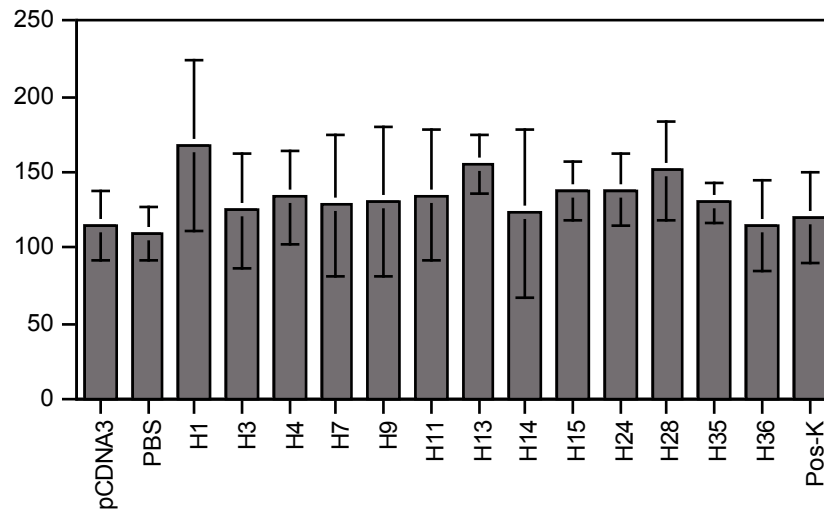


Abb. 33: Gewichtsdifferenz von DNA-immunisierten Hühnern während der *E. tenella*-Belastungsinfektion.

Gewichtszunahme/Tier (Gewichtsdifferenz von Tag 7 und Tag 0 p.i.). H1 bis H36: verschiedene pCDNA3myc-Konstrukte. pCDNA3: Vektorkontrolle (pCDNA3myc). PBS: Tiere, die lediglich PBS erhielten. Pos-K: Positivkontrolle (Hühner nach überwandener *E. tenella*-Erstinfektion). Versuchsgruppen (n=5).

### 3 Diskussion

Da Eimerieninfektionen eine adäquate Immunprotektion gegen Reinfektionen induzieren, erscheint die Entwicklung eines rekombinanten Impfstoffes erfolgversprechend (Jenkins, 98). Bisher durchgeführte Untersuchungen auf diesem Gebiet führten zwar zur Identifizierung einiger Eimerienantigene, mit denen jedoch in Immunisierungsstudien lediglich Teilerfolge erzielt werden konnten (Vermeulen, 98). Vermutlich sind hierfür nicht nur die eingesetzten Antigene verantwortlich, sondern auch die Art der Antigenapplikationen. Die Entwicklung eines erfolgreichen Impfstoffes erfordert daher die Identifizierung neuer Antigene und die Anwendung von möglicherweise effizienteren Applikationsrouten.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, neue sekretorische *E. tenella*-Proteine zu identifizieren, und diese mittels DNA-Immunisierung zu testen. Zunächst wurden die drei bekannten *E. tenella*-Antigene SO7 (Profous-Juchelka et al., 88), TA4 (Brothers et al., 88) und EtMIC1 (Tomley et al., 91) eingesetzt, um ein DNA-Immunisierungsprotokoll zu erstellen. Dabei wurde außerdem der Einfluss von zwei unterschiedlichen Vektoren und eines stabilisierenden Fusionspartners EGFP auf die Immunantwort nach DNA-Immunisierung überprüft. Zusätzlich wurden die zwei proinflammatorischen Zytokine chIL-18 und chIFN- $\gamma$  zur Koimmunisierung eingesetzt. Die Identifizierung von sekretierten Molekülen von *E. tenella* erfolgte zum einen über einen bioinformatischen Ansatz und zum anderen über ein experimentelles Verfahren in Hefen.

#### 3.1 Sekretorische Eimerienproteine als Impfstoffkandidaten

Die Identifizierung von Parasitenantigenen, die eine protektive Immunantwort gegen natürliche Infektionen vermitteln, ist ein entscheidender Punkt in der Impfstoffentwicklung (Jenkins, 98; Lillehoj und Trout, 96; Vermeulen et al., 01). Verschiedene Impfstoffe gegen komplexe Krankheitserreger wie Plasmodien (Bojang et al., 01; Kester et al., 01) oder Leishmanien (Campos-Neto et al., 02; Coler et al., 02; Skeiky et al., 02) enthalten Oberflächenantigene und werden zur Zeit in klinischen Studien getestet. Bei diesen fortgeschrittenen Impfstoffansätzen werden zahlreiche potentiell protektive Antigene eingesetzt. Es wird weiterhin versucht, die Wirksamkeit vor allem durch eine geeignete Applikationsform zu erhöhen. Jedoch

bleibt festzustellen, dass trotz intensiver Bemühungen durchschlagende Erfolge noch ausstehen. Die bisherigen Impfstoffkandidaten von Eimerien sind auch auf der Oberfläche lokalisiert oder werden sekretiert, konnten aber ebenfalls in Immunisierungsstudien nicht überzeugen (Jenkins, 98).

Die Suche nach protektiven Antigenen von Eimerien konzentrierte sich bisher vor allem auf die Immunanalyse mit Infektionsseren und auf die Identifizierung invasionsblockierender Antikörper (Crane et al., 88; Miller et al., 89; Profous-Juchelka et al., 88; Refega et al., 03). Da die Immunprotektion gegen Eimerien über den zellulären Arm der Immunantwort vermittelt wird (Rose, 96), könnten diese konventionellen Screening-Verfahren fehlschlagen.

Aufgrund dieser Erkenntnisse sollten in der vorliegenden Arbeit sekretierte Moleküle und Oberflächenantigene der frühen invasiven Stadien (Sporozoiten und Merozoiten) identifiziert werden. Darunter sollten sich, so die Hypothese, potentiell protektive Antigene befinden. Hintergrund dieser Überlegungen ist, dass diese Moleküle direkt mit den Wirtszellen interagieren und daher vermutlich bevorzugt dem Wirtsimmunsystem präsentiert werden.

Die Identifizierung sekretorischer Proteine wurde über eine experimentelle Analyse in Hefen und über eine *in silico*-Analyse von *E. tenella*-EST-Datenbanken durchgeführt. Beide Methoden machen sich zu Nutze, dass sekretierte Proteine, bis auf wenige Ausnahmen, eine N-terminale Konsensussequenz tragen, die ihre Translokation in das ER vermittelt. Da dieser Prozess in eukaryotischen Zellen hochkonserviert ist, sind die Signalpeptide von Proteinen funktionell austauschbar. Des Weiteren können Signalsequenzen aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften sehr gut identifiziert werden (Klein et al., 96; Nielsen und Krogh, 98).

Die in der vorliegenden Arbeit angewandte Signalpeptidselektion in Hefen erlaubt es, mit einer hohen Erfolgsquote Gene zu isolieren, die für sekretierte Proteine kodieren (Klein et al., 96). Hierzu war es zunächst notwendig, eine cDNA-Bank von *E. tenella*-Sporozoiten herzustellen, die dann zur Selektion in die Hefemutanten transfiziert wurde. Die cDNA-Bank resultierte in  $5 \times 10^5$  cfu, was einer niedrigen Ausbeute entsprach (Jacobs et al., 99). Einerseits kann dafür das limitierte Ausgangsmaterial verantwortlich gewesen sein, andererseits verursachte der relativ große Klonierungsvektor pSUC2 eine Verringerung der Transformationseffizienz (Inoue et

al., 90). Vermutlich könnte durch größere Mengen von Ausgangsmaterial und durch die Anwendung alternativer Transformationsmethoden (z. B. Elektroporation) die Ausbeute erhöht werden (Miller, 94).

Die Hefeselektion führte zur Identifizierung von 191 positiven Klonen, welches in Bezug auf die getesteten Klone einem Selektionsfaktor von etwa 1000 entsprach. In früheren Arbeiten wurden Selektionsfaktoren zwischen 5000 bis 50000 beschrieben, wobei die 10- bis 100-fach höhere Anzahl positiver Hefetransfektanten getestet wurde (Jacobs et al., 97; Klein et al., 96). Demnach scheint die Selektionsrate in einer gewissen Abhängigkeit zu der Zahl der Ausgangsklone zu stehen, was vermutlich an der unterschiedlichen technischen Umsetzung des Screening-Verfahrens liegt. Die Anzahl der hier gefundenen falsch-positiven Klone liegt mit 15 % im Rahmen der dokumentierten Fehlerquote von 10 - 20 % (Jacobs et al., 97; Klein et al., 96). Die Identifizierung der falsch-positiven Klone beruht vermutlich auf zufälligen DNA-Sequenzen, die einer Signalsequenz ähnlich sind und damit eine Sekretion zulassen (Kaiser et al., 87). Verstärkt wird dieser Effekt dadurch, dass schon eine schwache Invertasesekretion von nur 3 % des Levels der Wildtyp-Hefe ausreicht, um das Hefewachstum auf Selektionsmedium zu ermöglichen (Kaiser und Botstein, 86).

Generell schwierig zu bestimmen ist die Anzahl falsch-negativer Sequenzen. Es besteht die Möglichkeit, dass die Sequenz aufgrund ungleichmäßiger oder unvollständiger Amplifikation nicht in der cDNA-Bibliothek vorhanden ist oder die Bibliothek nicht umfassend genug ist, um alle Transkripte abzudecken. Zum anderen wird das Signalpeptid möglicherweise von der Hefezelle nicht erkannt. Obwohl in vielfältigen Studien gezeigt werden konnte, dass Signalsequenzen verschiedener Organismen funktionell austauschbar sind, trifft dieses nicht immer zu (Galliciotti et al., 01). Schließlich können biologische Eigenschaften, wie zum Beispiel Toxizität des exprimierten Gens dazu führen, das Zellwachstum zu inhibieren oder Zellschädigungen hervorzurufen.

Die Hefemethode erlaubt es, im Vergleich zur zufälligen Sequenzierung von EST-Sequenzen Gene, die für sekretorische Proteine kodieren, mit einer fünffachen Effizienz anzureichern und zu isolieren (Klein et al., 96; Taft et al., 02). Des Weiteren kann sie bei jedem höheren und niederen eukaryotischen Organismus angewendet

werden (Goo et al., 99; Jacobs et al., 97; Musembi et al., 00). Im Vergleich zu anderen Systemen ist die Selektion in Hefen weit entwickelt (Chen und Leder, 99; Tashiro et al., 99) und erlaubt die gleichzeitige Testung von bis zu  $10^8$  Transfektanten (Jacobs et al., 99).

Insgesamt wurden mit Hilfe der Hefeselektionsmethode 25 unabhängige Sequenzen identifiziert. Um zusätzliche Informationen über die Sequenzen zu erhalten, wurden diese mit *E. tenella*-EST-Datenbanken verglichen. Dieser Schritt war notwendig, da das Hefesystem nur für den Einsatz kurzer DNA-Fragmente optimiert ist (Jacobs et al., 99). Die Analyse der EST-Sequenzen zeigte eine eindeutige stadienspezifische Verteilung der gefundenen Eimeriensequenzen. Da die Isolierung aus Sporozoiten vorgenommen wurde, stammten die meisten EST-Sequenzen wie erwartet aus Sporozoiten. Über die stadienspezifische Expression von sekretorischen Proteinen bei Apikomplexa ist zur Zeit noch wenig bekannt, so dass die Daten erste Hinweise auf das Expressionsprofil und die Lokalisierung der identifizierten Sequenzen geben können. Für die Entwicklung einer Vakzine ist das Wissen um die stadienspezifische Expression der Zielproteine wichtig. Bei Malaria gibt es verschiedene Ansätze, welche die Bekämpfung von Sporozoiten oder von Merozoiten des Blutstadiums zum Ziel haben und dementsprechend Antigene verschiedener Entwicklungsstadien beinhalten (Moorthy et al., 04a). Auch frühere EST-Studien konnten zeigen, dass bei *E. tenella* und anderen Apikomplexa eine stadienspezifische Transkription unterschiedlicher Gene stattfindet (Li et al., 03; Ng et al., 02). Neben der reinen Analyse von EST-Datenbanken zeigten auch microarray-Analysen große Unterschiede in der Expression von Genen aus verschiedenen Lebensstadien von *P. falciparum* und *T. gondii* (Bozdech et al., 03; Cleary et al., 02). Diese Daten stimmen allgemein sehr gut mit experimentellen Daten überein und können für die Vorauswahl von Impfstoffkandidaten von großem Nutzen sein.

Mit der bioinformatischen Methode konnten 84 *E. tenella*-Sequenzen identifiziert werden, die signifikante Homologien zu Proteinen mit N-terminaler Konsensussequenz zeigten. Diese Arbeiten wurden von R. Marhöfer und P. Selzer (Intervet Innovation GmbH, Schwabenheim) durchgeführt. Die weitere Analyse zeigte, dass 17 Sequenzen Homologien zu Mitochondrienproteinen aufwiesen. In zukünftigen Studien könnte die Anzahl dieser Proteine durch die Anwendung eines verbesserten Algorithmus ausgeschlossen werden (Bendtsen et al., 04). Für die

Entwicklung eines Impfstoffes sind diese Proteine von geringer Bedeutung, da die Moleküle in der Regel nicht dem Immunsystem zugänglich sind. Mitochondrienproteine könnten jedoch als Ziele für einen chemotherapeutischen Ansatz dienen. Beispielsweise greifen einige Malaria-Medikamente wirksam in den Stoffwechsel von Mitochondrien ein (Krungrai et al., 97; Vaidya, 04).

Die hier beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass die *in silico*-Strategie eine hocheffiziente Methode darstellt, durch die sekretorische Sequenzen aus EST-Datenbanken extrahiert werden können. Dabei kann aus großen Datenmengen eine überschaubare Anzahl von Sequenzen identifiziert werden. Der Ansatz basiert auf der Analyse von signifikanten Sequenzhomologien zu schon bekannten Proteinen, die eine Signalsequenz tragen. Daraus ergibt sich der Vorteil, dass aufgrund der Analogien eine direkte Vorhersage über die Lokalisierung und Funktion der identifizierten Sequenzen ermöglicht wird. Hieraus können dann direkt potentielle Antigene oder Zielmoleküle für therapeutische Ansätze ausgewählt werden.

Andere bioinformatische Analysen zur Identifizierung von Signalsequenzen arbeiten beispielsweise mit virtuellen ORF aus Genom-Datenbanken (Foth et al., 03). Der Nachteil dieser Methoden besteht darin, dass Sequenzen identifiziert werden, deren Stadienspezifität und Funktion nachträglich weiter analysiert werden müsste.

Das Hefesystem bietet die Möglichkeit, die bioinformatischen Daten in kurzer Zeit zu verifizieren. Das zeigten die sechs überlappenden Sequenzen, die sowohl mit der bioinformatischen Methode als auch mit dem Hefeansatz identifiziert werden konnten. Zusätzlich besitzt die Hefemethode den Vorteil, dass neue, bis dahin unbekannte Proteine identifiziert werden können. In der vorliegenden Arbeit konnten potentielle N-terminale Signalsequenzen von 22 neu identifizierten sekretorischen *E. tenella*-Proteinen präsentiert werden. Lediglich drei der insgesamt 25 positiven Sequenzen, die mit dem Hefesystem identifiziert wurden, waren identisch zu den schon bekannten *E. tenella*-Proteinen EtMIC5 (Brown et al., 00), TA4 (Brothers et al., 88) und SAG10 (Tabares et al., 04).

Mit der bioinformatischen Analyse wurden in der vorliegenden Arbeit etwa dreimal mehr sekretorische Sequenzen identifiziert als mit der Hefemethode. Obwohl dieser rein quantitative Unterschied durch weiteres Durchmustern mit der Hefemutante



reduziert werden könnte, sind für die gefundenen Unterschiede vermutlich noch weitere Faktoren verantwortlich. Ein Faktor kann die bereits im Vorfeld eingeschränkte Auswahl der cDNA-Sequenzen sein. Während für die bioinformatische Analyse sowohl Sporozoiten- als auch Merozoiten-cDNA-Datenbanken genutzt wurden, kam in der Hefeselektionsanalyse lediglich Sporozoiten-cDNA zum Einsatz. Auch technische Gründe, wie etwa die Komplexität der cDNA-Bank, können zur geringen Anzahl unabhängiger Sequenzen beigetragen haben (Jacobs et al., 99). Des Weiteren wurde eine hohe Redundanz der cDNA-Sequenzen festgestellt, die mit der Hefemethode identifiziert wurden. Dabei fiel eine ungleichmäßige Verteilung der Sequenzen auf. Die fünf am häufigsten identifizierten Moleküle deckten ca. 60 % der gesamten untersuchten Sequenzen ab. Es handelte sich hierbei nicht um die natürliche Sequenzverteilung innerhalb der sekretorischen Sequenzen von Sporozoiten. Die Über- oder Unterrepräsentierung von Sequenzen, die sich durch die Analyse in der Hefe ergab, beruht vermutlich auf der Herstellung oder Expression der cDNA-Fragmente, nicht jedoch auf den spezifischen Eigenschaften der heterologen Proteinfragmente (Jacobs et al., 97; Klein et al., 96; Taft et al., 02). Zukünftig könnte eine negative Selektion der cDNA-Bank von *E. tenella*-Sporozoiten gegen die fünf redundanten Sequenzen die Suche nach neuen sekretorischen Proteinen effizienter gestalten.

Beide Methoden beruhen ausschließlich auf der Identifizierung der N-terminalen Signalpeptide, die jedoch noch keinen Beweis für die letztendliche Lokalisierung der Moleküle darstellen. Hinweise auf die endgültige Lokalisierung der Proteine können durch die Überprüfung der publizierten Daten der homologen Proteine gewonnen werden. Da die Lokalisierung von Proteinen über zusätzliche Signale in der Aminosäuresequenz festgelegt wird, kann auch eine weitere Analyse der Sequenzen nach solchen sekundären Signalen zur Aufklärung der zellulären Lokalisierung beitragen (Joiner und Roos, 02). In Frage kommen beispielsweise verschiedenen C-terminal gelegene Retentionssignale, die zum Verbleib der Proteine im ER (HDEL am C-Terminus) oder Golgi-Apparat (Motif mit sauren und hydrophoben Aminosäuren) führen. Auch die Signale der Proteine, die für die Apikomplex-spezifischen Organellen (Mikronemen, Rhoptrien, dichte Granula und Apikoplast) bestimmt sind, können überprüft werden (Joiner und Roos, 02). Einschränkend ist jedoch hinzuzufügen, dass für solche Analysen vollständige cDNA Sequenzen

vorliegen sollten, was nur für eine begrenzte Anzahl von Sequenzen zutrifft. Die tatsächliche Lokalisierung der gefundenen Sequenzen muss letztendlich durch experimentelle Analysen überprüft werden.

Zur Zeit befindet sich das Projekt zur Sequenzierung des *E. tenella*-Genoms kurz vor dem Abschluss (Shirley et al., 04). Mit diesen umfassenden Sequenzinformationen können in zukünftigen Studien weitere potentielle Impfstoffkandidaten identifiziert werden. Hierbei könnte der automatisierte Prozess, der in der vorliegenden Arbeit vorgestellt wurde, zur Identifizierung von sekretorischen Proteinen einen wichtigen Beitrag leisten.

### **3.1.1 Charakterisierung der TA4-ähnlichen Proteinsequenzen**

Es konnten sowohl durch die *in silico*-Analyse als auch im experimentellen Ansatz zahlreiche TA4-ähnliche Sequenzen identifiziert werden. TA4 ist das Hauptoberflächenantigen von *E. tenella*-Sporozoiten (Brothers et al., 88; Files et al., 87). Aufgrund der vorliegenden Daten könnte es sich hierbei um verwandte Oberflächenproteine handeln, die stadienspezifisch exprimiert werden. Diese Vermutung wird durch eine publizierte Studie unterstützt, in der anhand von 23 unterschiedlichen TA4-ähnlichen Sequenzen gezeigt werden konnte, dass nur wenige in Sporozoiten und die Mehrzahl in Merozoiten transkribiert werden (Tabares et al., 04). Die Autoren gehen von ca. 250 TA4-ähnlichen Sequenzen im *E. tenella*-Genom aus. Aufgrund ihrer Oberflächenlokalisierung wurden die zur Zeit bekannten Proteine von den Autoren in *surface antigen* 1-23 (SAG 1-23) umbenannt.

Der verwandte Organismus *T. gondii* ist ebenfalls mit varianten Oberflächenproteinen bedeckt, die als *SAG1-related sequences* (SRS) bezeichnet werden (Lekutis et al., 01). Von diesen wurden bisher mehr als 20 kloniert und bioinformatische Analysen zeigten, dass mindestens 161 unterschiedliche SRS-Sequenzen existieren (Jung et al., 04; Lekutis et al., 01). Ähnlich wie bei *E. tenella* lassen sich die abgeleiteten Proteinsequenzen in zwei Gruppen einteilen, sie werden stadienspezifisch exprimiert und sind über GPI-Anker in der Zelloberfläche verankert (Lekutis et al., 01; Manger et al., 98). Es gibt Koexpressionen von definierten SRS-Genen innerhalb von verschiedenen Parasitenstadien, es wird jedoch keine Variation auf den Zellen beobachtet (Lekutis et al., 01). Aufgrund der aufgezeigten Parallelen zwischen *E.*

*tenella*-SAG- oder *T. gondii*-SRS-Proteinen wird auch für die *E. tenella*-SAG-Proteinfamilie ein ähnliches Verteilungsmuster vermutet.

Variante Oberflächenproteine sind bei parasitischen Protozoen relativ weit verbreitet und dienen häufig der Immunevasion vor der Antikörperantwort des Wirtes (McCulloch, 04). Im Gegensatz zu *T. gondii* findet bei *Trypanosoma brucei* und *Giardia lamblia* ein zufälliger periodischer Wechsel des Oberflächenmantels statt, der es einigen Parasiten erlaubt den Attacken der Antikörperantwort des Wirtes zu entgehen (Lekutis et al., 01; McCulloch, 04; Nash, 02). Dabei wird auf jeder individuellen Zelle nur ein Vertreter einer varianten Multi-Genfamilie zur gleichen Zeit exprimiert. Im Gegensatz hierzu verfolgt *T. gondii* eine andere Strategie. Obwohl auch *T. gondii* lange im Wirt persistiert, entkommt der Parasit dem Immunsystem, indem er Gewebezysten bildet, in denen ein wenig stoffwechselaktives Ruhestadium überlebt. Die Rolle der SRS-Proteine in diesem Zusammenhang ist ungeklärt, sie scheinen aber am Invasionsprozess und/oder an der Immunevasion beteiligt zu sein (Dzierszinski et al., 00; He et al., 02; Lekutis et al., 01). Es wird beispielsweise angenommen, dass TgSAG1 eine Doppelfunktion als Adhäsionsmolekül und Immuntarget ausführt. TgSAG1 ist immundominant und wird ausschließlich von den sich schnell teilenden Tachyzoiten exprimiert. Persistierende Bradyzoiten besitzen einen anderen SAG-Oberflächenmantel und sind dadurch nicht der TgSAG1-spezifischen Immunantwort ausgesetzt (He et al., 02; Lekutis et al., 01).

Vergleicht man die oben genannten Organismen und ihre bekannte Antigenvariationen mit *E. tenella*, so fällt auf, dass diese im Gegensatz zu Eimerien sehr lange in ihren Wirten persistieren. *E. tenella* besitzt ein festes Entwicklungsprogramm mit einer sehr kurzen Entwicklungszeit und persistiert nur etwa sieben Tage im Wirt (Rose, 96). Dennoch könnten die *E. tenella*-SAG-Oberflächenproteine, ähnlich wie die varianten Oberflächenproteine anderer Parasiten, an der Immunevasion beteiligt sein. Da möglicherweise nur wenige immundominante SAG-Antigene auf der Sporozoitenoberfläche exponiert werden, bildet das Immunsystem lediglich gegen diese Moleküle spezifische Antworten aus. Die Merozoiten der zweiten Generation entwickeln sich etwa fünf Tage nach der Infektion und sind wahrscheinlich mit einer neuen varianten SAG-Oberfläche ausgestattet (Tabares et al., 04). Die gerade reifende spezifische Antwort gegen die frühen SAG-Proteine der Sporozoiten kann gegen diesen neuen Oberflächenmantel nicht wirken. Da die vermutete Immunevasion noch nicht die große Anzahl

unterschiedlicher SAG-Proteine erklärt, ist anzunehmen, dass von ihnen noch andere Funktionen ausgeführt werden. Analog zu den SRS-Proteinen von *T. gondii* wären beispielsweise Aufgaben bei der Zelladhäsion vorstellbar.

Es ist noch nicht abschließend geklärt, ob auf jeder Zelle eines Stadiums die gleichen *E. tenella*-SAG-Proteine exprimiert werden. Des Weiteren muss noch geklärt werden, ob auch die verschiedenen Merozoitenstadien unterschiedliche SAG-Proteine exprimieren. Interessanterweise liegen bisher keine Daten über TA4 (SAG)-ähnliche Proteine von anderen Eimerien vor. Genauere Studien müssten hier klären, ob ähnliche variable Oberflächenmoleküle existieren und welche Funktion sie übernehmen.

Zahlreiche *T. gondii*-SRS-Gene wurden in DNA-Immunisierungsstudien eingesetzt und führten teilweise zu einem Immunschutz gegen Belastungsinfektionen (Angus et al., 00; Nielsen et al., 99). Aufgrund der Analogien sind auch die TA4-ähnlichen-Moleküle von *E. tenella* vielversprechende Impfstoffkandidaten, die in zukünftigen Immunisierungsstudien bevorzugt eingesetzt werden sollten.

### **3.1.2 Identifizierte *E. tenella*-Proteine als Impfstoffkandidaten**

Ein Großteil der in der vorliegenden Arbeit identifizierten Moleküle ist an der Zellerkennung, am Invasionsprozess sowie an der Etablierung der Parasiten in der Wirtszelle beteiligt. Hierzu zählen die Homologen zu AMA von *Plasmodium* ssp. und *T. gondii* (Hehl et al., 97; Kocken et al., 00) und andere Proteine des Apikalkomplexes. Zahlreiche erfolgreiche Immunisierungsstudien mit *Plasmodium* ssp.-AMA1 in Nagern (Anders et al., 98; Crewther et al., 96) und Affen (Stowers et al., 02) verdeutlichen das protektive Potential von AMA1. Wenn auch bei anderen Eimerienarten des Huhns AMA1-analoge Moleküle identifiziert werden sollten, so wäre das Protein ein Kandidat, der möglicherweise einen artübergreifenden Schutz gegen die Eimerienarten des Huhns induzieren könnte. Unter natürlichen Bedingungen wird eine solche Kreuzimmunität zwischen Eimerienarten, die das Huhn besiedeln, nicht beobachtet (Prowse, 91). Jedoch ergab eine Studie von Crane et al. (1991), dass durch eine rekombinante Vakzine ein solcher artübergreifender Schutz gegen mehrere Eimerieninfektionen hervorgerufen werden kann.

Mikronemen sind Organellen zur Speicherung und geregelten Sekretion von

Molekülen, die an der speziellen Bewegung (*gliding motility*) und der Zellinvasion beteiligt sind (Sibley, 04). Die Proteine sind nicht nur strukturell, sondern auch funktionell innerhalb der Apikomplexa konserviert (Soldati et al., 01). Verschiedene Mikronemenproteine von Plasmodien, wie das *thrombospondin-related anonymous* Protein (TRAP), das TRAP-analoge *circum sporozoite TRAP related*-Protein (CTRP) oder das Circumsporozoiten-Antigen (CS) nehmen in der Impfstoffentwicklung gegen Malaria eine zentrale Rolle ein (Moorthy et al., 04a).

Die in der vorliegenden Arbeit gefundene EtMIC1-Sequenz (Tomley et al., 91) von *E. tenella* besitzt Analogien zum TRAP-Protein von *Plasmodium* ssp. (Robson et al., 88). Die identifizierte EtMIC4-Sequenz gehört ebenfalls zur TRAP-Familie und zeigt große Übereinstimmungen zu EtMIC1. Im Gegensatz zu EtMIC1 wird EtMIC4 konstitutiv auf der Oberfläche von Zooten exponiert (Tomley et al., 01). Kürzlich wurde ein EtMIC4-homologes Protein in *E. maxima* identifiziert (TmTFP250) (Witcombe et al., 03). Beide Proteine induzieren starke Antikörperantworten (Tomley et al., 01; Witcombe et al., 03). Ob es sich dabei auch um kreuzreaktive Antikörper handelt, muss jedoch noch geklärt werden.

Da die Funktion der Mikronemenproteine mit dem Invasionsprozess assoziiert ist, kommt vermutlich auch den Proteinen EtMIC2, EtMIC5 und TgMIC10 eine Rolle in diesen Prozessen zu.

Neben den zahlreichen Mikronemenproteinen wurden auch zwei Proteine identifiziert, die in den refraktilen Körperchen lokalisiert sind. Die Funktion dieser eimerienspezifischen Organellen ist noch unbekannt. Das SO7-Protein von *E. tenella* zeigte in früheren Immunisierungsstudien gute Resultate und wurde auch in der vorliegenden Arbeit eingesetzt (Crane et al., 91; Profous-Juchelka et al., 88). Ein weiteres Protein der refraktilen Körperchen von *E. tenella* ist EtA1. Das Protein besitzt Nukleotid-Transferase-Funktion und ist somit ein interessantes Zielmolekül für therapeutische Ansätze (Kramer et al., 93).

Das Oberflächenprotein Ea3-1E von *E. acervulina* erbrachte in mehreren Immunisierungsstudien sehr vielversprechende Resultate (Lillehoj et al., 00; Min et al., 01; Song et al., 00), so dass das *E. tenella*-homologe Protein ebenfalls als aussichtsreicher Impfstoffkandidat angesehen werden kann.

Die gefundenen homologen Sequenzen zu Proteinkinasen, Phosphatasen und Transportermolekülen dürften eine wesentliche Rolle in der zellulären Kommunikation, Regulation und Nährstoffaufnahme spielen (Delorme et al., 02; Kieschnick et al., 01; Kirk, 04). Die homologen Proteine Lag1, Notch-like-Rezeptor und das Synaptobrevin-ähnliche Moleküle sind vermutlich an der Signaltransduktion beteiligt (Nam et al., 02; Petcherski und Kimble, 00).

Generell stellen solche Proteine aussichtsreiche Zielmoleküle für therapeutische Ansätze dar (Delorme et al., 02; Doerig et al., 02; Kirk, 04), können aber aufgrund ihrer exponierten Lage auch für immunologische Interventionen von Interesse sein.

### **3.2 Immunreaktion von Hühnern nach DNA-Immunisierung**

DNA-Vakzine kommen vor allem als Impfstoffe gegen intrazelluläre Krankheitserreger in Frage (Doolan und Hoffman, 01; Seder und Hill, 00). Obwohl zur Zeit noch kein wirksamer DNA-Impfstoff zugelassen ist, wurden in den vergangenen Jahren einige Fortschritte auf diesem Gebiet erzielt. Neben Forschungen zur Bekämpfung viraler und bakterieller Krankheitserreger, wird auch versucht, die DNA-Immunisierung gegen parasitische Protozoen einzusetzen (Gurunathan et al., 00). So induzieren beispielsweise DNA-Impfstoffe gegen Malaria eine protektive CD8<sup>+</sup>-T-Zellantwort und werden momentan in Phase I-Studien getestet (Doolan und Hoffman, 01; Keitel et al., 99; Moorthy et al., 04b; Sedegah et al., 00). Auch zahlreiche DNA-Vakzinen gegen *T. gondii* induzieren zelluläre Immunantworten und vermitteln Immunschutz (Scorza et al., 03; Vercammen et al., 00). Viele intrazelluläre Krankheitserreger induzieren breite Immunreaktionen, wobei der zelluläre Arm wesentlich zur Induktion des Immunschutzes beiträgt (Seder und Hill, 00). Unter diesem Gesichtspunkt sind DNA-Impfstoffe besonders geeignet, denn sie induzieren ebenfalls ein breites Spektrum zellulärer und humoraler Immunantworten (Fynan et al., 93; Tang et al., 92; Ulmer et al., 93). Die qualitativen und quantitativen Aspekte der induzierten Immunantwort sind dabei abhängig von der applizierten DNA-Menge, wobei hohe DNA-Dosen vorzugsweise TH1-Typ-Antworten generieren (Barry und Johnston, 97). Darüber hinaus ist im Wesentlichen die zelluläre Lokalisierung des Antigens für die eingeschlagene Richtung der induzierten Immunantwort verantwortlich (Haddad et al., 98; Morel et al., 04; Torres et al., 99).

Ein weiterer Vorteil der DNA-Immunisierung besteht darin, dass die Herstellung des

Impfstoffes relativ einfach ist und auch eine größere Anzahl verschiedener Antigene getestet werden kann. Dies ist bei Eimerieninfektionen besonders vorteilhaft, denn durch die bisherigen Forschungen hat sich, wie oben dargestellt, noch kein schützendes Antigen herauskristallisieren können (Jenkins, 98).

In der vorliegenden Arbeit wurde ein DNA-Immunisierungsschema in Hühnern erarbeitet, wozu drei bekannte *E. tenella*-Antigene zum Einsatz kamen. Dabei wurden unterschiedliche Aspekte berücksichtigt, wie der Einfluss verschiedener Vektoren bzw. des stabilisierenden Fusionspartners EGFP. Des Weiteren wurden die inflammatorischen Zytokine chIL-18 und chIFN- $\gamma$  als Kostimulanzen eingesetzt. Basierend auf dem etablierten DNA-Immunisierungsschema wurden 13 neu-identifizierte sekretorische *E. tenella*-Proteine getestet.

### **3.2.1 Proteinexpression *in vitro***

Die Überprüfung der Proteinexpression der Vektorkonstrukte erfolgte in der Zellkultur in transfizierten COS-7- und HD11-Zellen.

Die Eimerien-EGFP-Fusionsproteine wurden mit einem EGFP-Antiserum nachgewiesen. Das Ergebnis wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie in COS-7-Zellen und Hühnerzellen (HD11) bestätigt. Die Resultate mit den Hühnerzellen zeigten auch, dass die Konstrukte für die Immunisierung von Hühnern geeignet sind.

Ein unerwartetes Ergebnis war, dass die TA4-Fusionsproteine im Gegensatz zu den SO7- und EtMIC1-Fusionsproteinen nicht mit einem *E. tenella*-Antiserum nachweisbar waren. Eine zu geringere Verfügbarkeit von TA4-Antikörpern im Serum ist hierfür nicht verantwortlich, da das Serum bakteriell exprimiertes TA4-Protein in gleicher Weise erkennt wie rekombinantes SO7-Protein (Daten nicht gezeigt).

Eine mögliche Erklärung ist, dass die B-Zellepitope des TA4-Anteils durch den EGFP-Anteil verdeckt wurden und deshalb für die TA4-Antikörper nicht zugänglich waren. Für diese Hypothese spricht zum einen, dass die TA4-Fusionsproteine mit EGFP-Serum das erwartete Molekulargewicht zeigten. Zum anderen ist das EGFP-Protein sehr stabil gegen Proteaseabbau und liegt auch bei starken Detergenzien wie 1 % SDS sowie in breiten pH-Bereichen und bei verschiedenen Redoxpotentialen noch im gefalteten Zustand vor (Tsien, 98). Daraus resultierte vermutlich eine sterische Behinderung der Antikörperbindung. Insgesamt sprechen die Argumente dafür, dass eine TA4-Expression stattfand.

Die Überprüfung der fusionsfreien Konstrukte im Immunblot ergab, dass lediglich die EtMIC1-Proteine nachweisbar waren, obwohl genspezifische Transkripte auch für die SO7- und TA4-Konstrukte gefunden wurden. Vermutlich wurden auch die SO7- und TA4-Konstrukte exprimiert, wobei die Proteinmenge unter der Nachweisgrenze des Immunblots lag.

Nach diesen Analysen führte EGFP aufgrund seiner stabilisierenden Eigenschaft zu einer verbesserten Proteinexpression. Inwieweit dies durch reine Proteinstabilisierung und durch den Schutz gegen Proteaseabbau bedingt ist, oder ob auch zusätzlich Faktoren auf der Transkriptions- oder Translationsebene eine Rolle spielen, müssen zukünftige Studien klären. Die stabilisierende Eigenschaft von Fusionspartnern bei der Proteinexpression wurde schon häufig beobachtet und wird u.a. zur Optimierung von Proteinausbeuten in heterologen Expressionssystemen genutzt (Stahl et al., 04).

Die Analyse der chIFN- $\gamma$ -Konstrukte in COS-7-Zellen zeigte die erfolgreiche Expression und Sekretion von chIFN- $\gamma$  in das Kulturmedium, so dass die chIFN- $\gamma$ -Freisetzung auch nach DNA-Immunisierung von Hühnern erwartet werden konnte. Diese Resultate stimmen mit Studien überein, die im gleichen System ähnliche Ergebnisse erzielen konnten (Heriveau et al., 00).

Weniger eindeutig waren die Resultate des chIL-18-Konstruktes. Mit Zellkulturüberständen von transfizierten COS-7-Zellen konnten Milzzellen eines Spendertieres zur chIFN- $\gamma$ -Produktion stimuliert werden, hingegen wurde bei den Zellen des zweiten Spendertieres keine Reaktion induziert. Wodurch dieser Unterschied auftrat ist ungeklärt. Es könnten technische Gründe, wie eine zu geringe Transfektionseffizienz als Ursache in Frage kommen. Auch das Fehlen von kostimulatorischen Faktoren/Rezeptoren, wie beispielsweise eine geringe Anzahl von IL-18-Rezeptoren auf der Oberfläche von T-Zellen, könnte für die Unterschiede verantwortlich sein. Beispiele aus dem Mausmodell zeigen jedoch, dass IL-18-Plasmide, die das Protein mit der natürlichen Signalsequenz exprimieren, *in vivo* zur Induktion von IFN- $\gamma$  führen (Kremer et al., 99). Daraus kann abgeleitet werden, dass auch in Hühnern die chIL-18-Expression über das chIL-18-Plasmid zur Freisetzung von chIL-18 führt.

Da aus Kapazitätsgründen nicht alle identifizierten Proteine in Immunisierungsstudien eingesetzt werden konnten, wurden 13 Sequenzen ausgewählt. Die Sequenzen



wurden in einen pCDNA3myc Vektor kloniert und die Proteinexpression in COS-7-Zellen überprüft. In der Immunblotanalyse konnten bei sieben Konstrukten entsprechende Signale detektiert werden. Der fehlende Proteinnachweis der übrigen Konstrukte könnte auf unzureichende Proteinexpression zurückzuführen sein. Die Ergebnisse der Sequenzanalysen zeigten, dass die Vektorkonstrukte die erwarteten cDNA-Sequenzen beinhalten.

### **3.2.2 Analyse der Antikörperantwort nach DNA-Immunisierung zur Bestätigung des Immunisierungserfolges**

Eine Immunisierung mit Plasmid-DNA erzeugt neben der zellulären Immunantwort auch eine Antikörperreaktion (Gurunathan et al., 00). Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Erfolg der DNA-Immunisierung über die Induktion einer spezifischen Antikörperantwort zu verfolgen. Darauf aufbauend wurde ein Immunisierungsprotokoll erstellt, mit dem neu identifizierte Antigene getestet werden sollten.

Antikörperreaktionen korrelieren nicht mit dem Immunschutz gegen Eimerieninfektionen. Deshalb kann deren Analyse lediglich einen allgemeinen Hinweis auf die Proteinexpression und darauf folgende Immunreaktion *in vivo* geben. In mehreren unabhängigen Versuchen konnte gezeigt werden, dass Hühner eine spezifische SO7-Antikörperantwort nach einer entsprechenden DNA-Immunisierung entwickelten. Der Fusionspartner EGFP hatte dabei keinen Einfluss auf die SO7-Antikörperkonzentration im Serum immunisierter Hühner. Eine vergleichbare Studie, in der ein Gen von *Mycoplasma* als EGFP-Fusionskonstrukt in Mäusen eingesetzt wurde, ergab ähnliche Resultate (Quinn et al., 02). Interessanterweise beschreiben die Autoren eine Verschiebung der Antikörper-Subklassen von IgG1 zu IgG2a durch den Einsatz des Fusionskonstruktes. IgG2a-Antikörper sind assoziiert mit einer TH1-Antwort. Ob sich dadurch auch eine höhere Protektion gegen Mycoplasmen ergibt, muss in dem Modell jedoch noch aufgeklärt werden. Bei Hühnern sind keine unterschiedlichen IgG-Subklassen bekannt, die mit einer bestimmten zellulären Reaktion assoziiert sind (Higgins, 96). Deshalb kann im vorliegenden Fall keine Aussage über die genaue Richtung der Immunreaktionen gemacht werden. Ob die von Quinn et al. (2002) beschriebene Verschiebung in Richtung TH1-Antwort auf das gesamte spezifische Fusionsprotein zurückzuführen ist oder eine generelle

Eigenschaft von EGFP darstellt, sind noch zu klärende Fragen.

Bei Tieren, die mit TA4- oder EtMIC1-Fusionskonstrukt (mit EGFP) immunisiert wurden, konnten keine TA4- bzw. EtMIC1-spezifischen Antikörper nach DNA-Immunisierung nachgewiesen werden, obwohl es sich um immundominante Antigene handelt (Profous-Juchelka et al., 88; Tomley et al., 91). Im Gegensatz zum EtMIC1-Fusionskonstrukt induzierte das TA4-Fusionskonstrukt spezifische EGFP-Antikörper. Es ist deshalb davon auszugehen, dass hier eine Proteinexpression stattfand, wobei EGFP vermutlich wesentliche B-Zellepitope des TA4-Proteins verdeckte. Dies stimmt auch mit den Daten der *in vitro*-Expression überein (siehe 3.2.1). Dagegen führte das EtMIC1-Fusionskonstrukt vermutlich zu keiner oder lediglich zu einer schwachen Proteinexpression *in vivo*.

Im Vergleich zur Immunisierung mit den rekombinanten Antigenen waren die Antikörperreaktionen der DNA-immunisierten Tiere in der vorliegenden Arbeit deutlich niedriger, oder konnten zum Teil nicht nachgewiesen werden. Tatsächlich findet man häufig niedrigere Antikörpertiter nach DNA-Immunisierung im Vergleich zur Immunisierung mit rekombinanten Antigenen oder nach natürlicher Infektion (Boyle et al., 96; Kang et al., 98). Obwohl durch DNA-Vakzinierung auch die humorale Antwort stimuliert wird, ist nicht generell mit einem hohen Antikörpertiter zu rechnen (Gurunathan et al., 00). Dies gilt insbesondere bei intramuskulärer DNA-Applikation und bei Verwendung von Konstrukten, die nicht zur Sekretion der exprimierten Proteine führen. Des Weiteren ist bekannt, dass bei DNA-Immunisierungen nur Proteinmengen im Nanogrammbereich exprimiert werden (Gurunathan et al., 00). Ein zusätzliches Problem ist die mögliche toxische Eigenschaft des exprimierten Antigens. Die verschiedenen Aspekte können insgesamt zu einer relativ niedrigen Antikörperreaktion führen, die unter Umständen nur unzureichend detektiert werden kann.

Studien, in denen verschiedene Promotoren und Polyadenylierungsstellen für die Hühnerimmunisierung untersucht wurden, zeigten die besten Resultate mit dem CMV-Promotor und der BGH-Polyadenylierungsstelle (Kodihalli et al., 97; Oshop et al., 02). Diese beiden Eigenschaften besitzen auch pCDNA3- und pVR1012-Vektoren, die in der vorliegenden Arbeit eingesetzt wurden. Der für die DNA-Immunisierung von Mäusen optimierte pVR1012-Vektor (Hartikka et al., 96),

generierte dabei im Vergleich zum pCDNA3-Vektor ähnliche Antikörperkonzentrationen. Beide Vektoren sind demnach in gleicher Weise für DNA-Immunisierungen von Hühnern geeignet. Da der pCDNA3-Vektor in zahlreichen Studien mit Hühnern schon erfolgreich eingesetzt wurde, kann auch in Zukunft auf diesen Vektor zurückgegriffen werden (Min et al., 01; Song et al., 00; Wang et al., 03). Zudem ist pCDNA3 für die Proteinexpression in COS-7-Zellen optimiert, wodurch ein besserer Proteinnachweis *in vitro* zu erwarten ist (Harvey et al., 97).

Die Art der Immunantwort hängt stark von der zellulären Lokalisierung des exprimierten Proteins ab. Cytosolische Proteine generieren im Gegensatz zu sekretierten Proteinen eine stärkere CD8<sup>+</sup>-T-Zellantwort (Forns et al., 99; Lewis et al., 99; Rush et al., 02). Da der Immunschutz gegen Eimerieninfektionen vermutlich vorrangig durch CD8<sup>+</sup>-T-Zellen vermittelt wird (Rose, 96), wurden in der vorliegenden Arbeit die Plasmide bewusst so konstruiert, dass die Proteine nicht sekretiert werden. Der Einsatz von Plasmiden, deren heterologe Eimeriengene eine Signalsequenz tragen, würde vermutlich höhere Antikörpertiter induzieren, aber auch eine verminderte CD8<sup>+</sup>-T-Zellantwort zur Folge haben. Dies müsste jedoch in vergleichenden Studien bestätigt werden.

### **3.2.3 Protektive zelluläre Immunantwort von Hühnern nach DNA-Immunisierung**

Die Analyse der Antikörperantwort wurde zur Überprüfung des Immunisierungserfolges und zur Erstellung einer geeigneten DNA-Immunisierungsstrategie durchgeführt. Sie korreliert jedoch nicht mit einem Immunschutz gegen Eimerieninfektionen. Zur Evaluierung einer protektiven Immunantwort wurden deshalb bei immunisierten Hühnern Belastungsinfektionen durchgeführt und die Oozystenausscheidung bestimmt. Um des Weiteren die zelluläre Immunreaktion zu ermitteln, bieten sich prinzipiell verschiedene Möglichkeiten an, die jedoch im Huhn aufgrund fehlender Immunreagenzien nur eingeschränkt durchführbar sind. In der vorliegenden Arbeit wurde versucht die zelluläre Immunreaktion über T-Zellproliferationsassays zu erfassen.

Die Überprüfung der T-Zellproliferation ergab, dass die PBL von Tieren nach

Immunisierung mit rekombinantem TA4-Protein eine TA4-spezifische T-Zellproliferation zeigten. Vermutlich wurde diese Reaktion durch die natürliche *E. tenella*-Infektion verstärkt. Arbeiten mit trunkierten Proteinen oder Peptid-mapping könnten dazu beitragen entsprechende T-Zellepitope zu identifizieren (Hoffmeister et al., 03). Nach DNA-Immunisierung und nach Immunisierung mit rekombinantem SO7-Protein konnten keine spezifischen T-Zellproliferationen erfasst werden, obwohl reaktive T-Zellen vorlagen, wie die Analyse mit ConA zeigte.

Die Ergebnisse der Lymphozytenproliferation sind insgesamt zurückhaltend zu bewerten, denn es bestehen große experimentelle Hürden, welche die Qualität der Lymphozytenproliferation von Hühnerzellen beeinflussen (Barta et al., 92; Schaefer et al., 85). Im Gegensatz zum Mausmodell sind in Bezug auf Hühner wenig eindeutige Daten bekannt. Unter anderem konnte bei Hühnern gezeigt werden, dass Makrophagen/Monozyten einen supprimierenden Effekt auf mitogenstimulierte Lymphozyten aufweisen (Vainio und Ratcliffe, 84). Die Ursache dieses Effektes ist nicht bekannt. Es wird diskutiert, dass möglicherweise ein sezernierter Faktor mit einem T-Zell-Oberflächenrezeptor interagiert und so eine Modulation der Lymphozyten-Aktivierung zur Folge hat (Varaldo et al., 89). Die besten Resultate werden mit der, auch in dieser Arbeit durchgeführten, langsamen Zentrifugation erreicht (Smith et al., 95). Obwohl die Daten der mitogenstimulierten T-Zellen zeigten, dass reaktive T-Zellen aufgereinigt wurden, können supprimierende Effekte, die zu einer verminderten Lymphozytenproliferation führten, nicht ausgeschlossen werden. Es besteht auch die Möglichkeit, dass keine oder nur sehr schwache T-Zellantworten durch die Immunisierungen induziert wurden, die in den untersuchten PBL nicht nachweisbar waren. Hierfür sprechen auch die sehr geringen Antikörpertiter nach DNA-Immunisierung. Bei Säugern und Hühnern wird eine B-Zellantwort durch Hilfe von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen verstärkt (Rose, 96), so dass eine geringe B-Zellantwort vermutlich auch eine schwache T-Zellantwort als Ursache hat. Über eine induzierte CD8<sup>+</sup>-T-Zellantwort lässt sich im vorliegenden Fall keine Aussage machen. Diese müsste zum Beispiel anhand eines zytolytischen Assays charakterisiert werden.

Die Überprüfung der Lymphozytenproliferation wurde auf die im Blut zirkulierenden PBL fokussiert, da hierüber aktivierte T-Zellen des gesamten Organismus analysiert werden können. Dadurch sollte sichergestellt werden, dass auch die über die intramuskuläre Immunisierung aktivierten T-Zellen erfasst werden. Da es sich bei

Eimerieninfektionen um eine intestinale Erkrankung handelt, sind vermutlich die lokalen Immunzellen von entscheidender Bedeutung. Möglicherweise könnte daher die zusätzliche Überprüfung der IEL in zukünftigen Studien verbesserte Resultate liefern.

Einen weiteren Aspekt stellt der Zeitpunkt der Analysen dar. Die Überprüfung der T-Zellproliferation wurde auf das Versuchsende, d.h. zehn Tage nach der Belastungsinfektion, beschränkt. Dieser Zeitpunkt erschien sinnvoll, da in Versuchen mit Sporozoitenantigen gezeigt werden konnte, dass acht, zehn und 14 Tage nach einer *E. tenella*-Infektion die eimerienspezifischen Proliferationsraten von T-Zellen (PBL) am höchsten waren (Breed et al., 96; Breed et al., 97). Um bessere Hinweise auf die induzierte Immunantwort nach DNA-Immunisierung zu erhalten, wäre es jedoch zukünftig sinnvoll, die zelluläre Immunantwort direkt nach Immunisierung zu analysieren. Vermutlich könnte damit die spezifische Immunantwort gegen das applizierte Antigen besser erfasst werden, da keine "störenden" Immunantworten der Eimerieninfektion interferieren würden. Wie schon diskutiert, bietet sich dazu der Proliferationstest nur bedingt an. Aufschlußreich wäre die Detektion von  $\text{chIFN-}\gamma$ , welches von aktivierten T-Lymphozyten sezerniert wird und mit der Kontrolle von Primärinfektionen in Zusammenhang steht (Lowenthal et al., 97; Ovington et al., 95). Die Analyse könnte über RT-PCR aus Zellen der Darmmukosa erfolgen und so einen Hinweis über die lokale Immunreaktion geben (Chai und Lillehoj, 88; Choi et al., 99). Des Weiteren wäre es sinnvoll, die Subpopulationen von T-Zellen in der Darmmukosa zu bestimmen. So wird in einer Studie mit dem 3-1E-Antigen von *E. acervulina* beschrieben, dass nach intramuskulärer DNA-Immunisierung in der Dünndarm-IEL-Population eine höhere Anzahl von  $\text{CD4}^+$ - und  $\gamma\delta^+$ -T-Zellen und eine verminderte Anzahl von  $\text{CD8}^+$ -T-Zellen vorlag (Song et al., 00). Die Autoren diskutieren, dass dies möglicherweise mit dem beobachteten Immunschutz korreliert. Es wäre interessant zu sehen, ob die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Antigene nach DNA-Immunisierung ebenso eine Veränderung der T-Zellsubpopulationen und/oder  $\text{chIFN-}\gamma$ -Freisetzung induzieren. Zur Charakterisierung der spezifischen  $\text{CD8}^+$ -T-Zellantwort könnten des Weiteren zytolytische Assays durchgeführt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden 13 neu identifizierte *E. tenella*-Sequenzen zur DNA-Vakzinierung eingesetzt. Hierbei konnte in einem ersten orientierenden Versuch

eine Reduktion der Oozystenausscheidung durch H15 und durch das TA4-Homolog H7 erreicht werden. Diese Resultate waren jedoch in einem weiteren Immunisierungsversuch, der im Rahmen einer Diplomarbeit durchgeführt wurde, nicht reproduzierbar (Gehre, 04). Auch die Studien mit den schon bekannten *E. tenella*-Antigenen SO7, TA4 und EtMIC1 ergaben keinen Immunschutz gegen Belastungsinfektionen.

Hierfür können vielfältige Gründe verantwortlich sein. Zum einen könnten die eingesetzten Proteine nicht oder nur unzureichend geeignet sein einen adäquaten Immunschutz zu induzieren. Das gilt insbesondere für die neu identifizierten Sequenzen, für die es bisher keine Hinweise bezüglich ihrer Immunogenität gab. Jedoch wurde zumindest mit dem Modellantigen SO7 die Induktion einer protektiven Immunantwort erwartet, denn das Protein wurde schon in mehreren Immunisierungsstudien eingesetzt, in denen Oozystenreduktionen nach Belastungsinfektionen erzielt werden konnten (Crane et al., 91; Liberator et al., 89; Miller et al., 89; Profous-Juchelka et al., 88).

Das TA4-Protein scheint ebenfalls ein vielversprechender Impfstoffkandidat zu sein und zeigte in einem *in vitro*-Assay und in Immunisierungsstudien protektives Potential (Files et al., 87). Wie an anderer Stelle bereits diskutiert, sind möglicherweise auch andere Mitglieder der TA4-Proteinfamilie bzw. das EtMIC1-Protein als Impfstoffkandidaten geeignet (siehe 3.1.1 bzw. 3.1.2).

Aus den Resultaten der vorliegenden Arbeit kann nicht geschlossen werden, dass die eingesetzten Antigene für die Impfstoffentwicklung ungeeignet sind. Beispielsweise zeigte eine kürzlich publizierte Studie, dass die DNA-Immunisierungen mit TA4- und EtA1-Sequenzen von *E. tenella* zu einer Verringerung der Blinddarmläsionen nach einer Belastungsinfektion führten (Wu et al., 04). Da in dieser Studie lediglich ein Versuch durchgeführt wurde, müssten die Resultate durch größer angelegte Immunisierungsstudien belegt werden. Ähnliche Resultate wurden für eine DNA-Vakzine mit der SO7-Sequenz publiziert (Kopko et al., 00).

Insgesamt sprechen aber die publizierten Daten und die Resultate der vorliegenden Arbeit dafür, dass die eingesetzten Immunisierungsstrategien in Kombination mit den verwendeten Proteinen zu ineffizient sind, um den gewünschten protektiven Effekt zu generieren. Daher sind vermutlich, neben der weiteren Identifizierung neuer Kandidatenantigene, grundlegend neue Immunisierungsstrategien notwendig.

Eine relativ einfach durchzuführende Modifikation besteht darin, kostimulatorische Moleküle einzusetzen. In Frage kommen Zytokine die eine essentielle Rolle bei der Aktivierung von Effektor-T-Zellen spielen und zur Verstärkung der Immunreaktion beitragen können (Gurunathan et al., 00). In der vorliegenden Arbeit wurden erste Ansätze in diese Richtung durchgeführt und die Hühnerzytokine chIFN- $\gamma$  und chIL-18 als Kostimulanzen für die DNA-Immunisierung eingesetzt. Die Resultate ergaben jedoch keine auffälligen Unterschiede bezüglich der Serokonversion oder Oozystenausscheidung. Im Gegensatz dazu konnte in DNA-Immunisierungsstudien mit dem *E. acervulina* 3-1E-Antigen die protektive Wirkung durch Koapplikation mit chIFN- $\gamma$ -Plasmid verstärkt werden (Lillehoj et al., 00). Eine andere Studie mit *E. acervulina* 3-1E-Antigen zeigte, dass die Wirkung einer suboptimalen DNA-Vakzindosis durch gleichzeitige Applikation von chIFN- $\gamma$ -Plasmid verstärkt werden kann (Min et al., 01). In der gleichen Studie wurden noch weitere Hühnerzytokine und Chemokine als DNA-Kostimulanzen getestet. Insbesondere die Koapplikation von chIL-8, Lymphotoaktin, chIL-15, chTGF- $\beta$ 4 und chIL-1 $\beta$  führte zu einer Oozystenverminderung im Vergleich zur Plasmidkontrolle. In einer anderen Studie mit Hühnern zeigte die Koapplikation mit einem IL-2-Plasmid einen verbesserten Immunschutz gegen das *infectious bursal disease virus* (IBSV) (Hulse und Romero, 04). Zur Zeit sind nur wenige Daten zur DNA-Koapplikation von Hühnerzytokinen veröffentlicht worden, so dass noch großer Klärungsbedarf hinsichtlich ihrer Wirkung besteht. Mehr Informationen liegen aus zahlreichen Studien im Maussystem vor, die zeigen, dass die Koimmunisierung mit DNA-Plasmiden, die Informationen für Zytokingene tragen, zu einer modifizierten Immunantwort führen können (Gurunathan et al., 00).

Im Zusammenhang mit Eimerieninfektionen sind besonders die Zytokine IL12 und IL-18 interessant, die nach DNA-Immunisierung zu einer höheren zellulären Proliferation führen und die CD8<sup>+</sup>-T-Zellantwort stimulieren (Kim et al., 98). Jedoch ist zu bemerken, dass zur Zeit noch kein IL12-äquivalentes Hühnerzytokin identifiziert wurde.

Welche Funktion das chIL-18 bei Eimerieninfektionen einnimmt, ist bisher unklar. Allerdings konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von Hühner-Milzzellen mit chIL-18 zum einen zur chIFN- $\gamma$ -Sekretion und Milzzellproliferation führt und zum anderen eine verstärkte MHC-II-Präsentation bewirkt (Gobel et al., 03). Des Weiteren ergab ein Vergleich der Effekte von chIL-2 und chIL-18, dass chIL-2 hauptsächlich

eine CD8<sup>+</sup>-T-Zellproliferation und chIL-18 überwiegend eine CD4<sup>+</sup>-T-Zellproliferation induziert. Interessanterweise war die Wirkung von chIL-18 bei PBL von einer zusätzlichen TZR-Stimulation abhängig, was vermutlich an einer verminderten IL-18-Rezeptor-Expression liegt (Gobel et al., 03). IL-18 von Säugern, dem eine analoge Funktion zukommt, wird von vielen Zelltypen und Geweben sekretiert, unter anderem auch von intestinalen Epithelzellen (Sugawara, 00). Daher könnte IL-18 in Verbindung mit Eimerieninfektionen von großen immunologischen Interesse sein. Unterstützend kommen Daten aus dem Maussystem hinzu, die zeigen, dass bei *Plasmodium*- und anderen intrazellulären Infektionen IL-18 eine essentielle Rolle zukommt (Sugawara, 00). Ob chIL-18 jedoch tatsächlich eine kritische Rolle bei Eimerieninfektionen einnimmt, müssen weitere experimentelle Daten zeigen.

### **3.2.4 Ausblick für alternative DNA-Applikationen und neue Immunisierungs-Strategien bei Hühnern**

Die Ergebnisse der Immunisierungsstudien dieser Arbeit erbrachten keine reproduzierbaren Erfolge. Auch andere Immunisierungsstudien gegen Eimerieninfektionen, die mit intramuskulärer DNA-Applikation (Kopko et al., 00; Lillehoj et al., 00) oder anderen Verfahren (Bhogal et al., 92; Binger et al., 93; Crane et al., 91; Crane et al., 88; Danforth et al., 89; Kim et al., 89; Wallach et al., 95) durchgeführt wurden, zeigten keine durchschlagenden Erfolge. Daher sollten in zukünftigen Studien grundlegend neue Ansätze der DNA-Applikation und die Kombination mit anderen Immunisierungsmethoden im Vordergrund stehen.

Eimerieninfektionen induzieren eine komplexe Immunantwort, die eine starke humorale und zelluläre Reaktion einschließt. Sowohl für die Kontrolle von Erstinfektionen als auch für die Induktion der Immunität ist hauptsächlich der zelluläre Arm der Immunantwort verantwortlich (Lillehoj, 98; Long, 93; Rose et al., 88b; Rose et al., 92). Jüngste Untersuchungen mit transgenen Mäusen legen zudem den Schluss nahe, dass nicht ein bestimmter Effektormechanismus den Immunschutz vermittelt. Vermutlich tragen hierzu verschiedene, noch nicht bekannte zelluläre Immunreaktionen bei (Roberts et al., 96; Smith und Hayday, 98; Smith und Hayday, 00b). Anschaulich wird dies anhand einer Studie, die zeigte, dass sowohl MHCI- als auch MHCII-defiziente Mäuse einen adäquaten Immunschutz gegen Reinfektionen



mit *E. vermiformis* aufbauen konnten (Smith und Hayday, 00b). Im Zentrum dieser Reaktionen stehen hauptsächlich  $\alpha\beta^+$ -T-Zellen, die sich als essentiell für eine effektive Immunprotektion herausstellten (Smith und Hayday, 98). Zur Zeit wird allgemein davon ausgegangen, dass vorwiegend CD8<sup>+</sup>-T-Zellen den Immunschutz gegen Eimerieninfektionen vermitteln (Rose et al., 92; Trout und Lillehoj, 96). Jedoch fehlen in diesem Zusammenhang noch weitere Daten, um ein genaueres Bild zu zeichnen. Interessanterweise scheint für die Ausbildung der Immunität keine bestimmte primäre Effektorantwort notwendig zu sein. Beispielsweise zeigten Studien mit IFN- $\gamma$ -knockout Mäusen, dass IFN- $\gamma$  zwar für die effektive Kontrolle einer primären Eimerieninfektion essentiell ist, jedoch keinen Einfluss auf die Induktion eines adäquaten Immunschutz hat (Smith und Hayday, 98). Da es sich bei Eimerieninfektionen ausschließlich um eine intestinale Erkrankung handelt, spielen vermutlich die lokalen T-Zellen eine bedeutende Rolle (Yun et al., 00).

Als Konsequenz für die Impfstoffentwicklung ergibt sich hieraus, dass eine möglichst komplexe und lokale zelluläre Immunantwort generiert werden sollte. Von den zur Zeit bekannten rekombinanten Impfstoffansätzen kommt die DNA-Immunisierung diesem Anforderungsprofil sehr nahe (Gurunathan et al., 00).

In den letzten Jahren wurden vielversprechende DNA-Impfstoffe für den Einsatz gegen parasitische Protozoen getestet. Beispielsweise werden durch ein Plasmid, welches die genetische Information für das *P. yoelii*-CS-Protein enthält, spezifische zytolytische CD8<sup>+</sup>-T-Zellantworten hervorgerufen, die mit einer massiven Reduktion der Parasitenlast nach einer Reinfektion mit *P. yoelii* einhergehen (Sedegah et al., 94). Ähnlichen Immunschutz über CD8<sup>+</sup>-T-Zellantworten generiert auch ein DNA-Impfstoff für *T. gondii*, welcher die genetische Information für das "Dichte Granula"-Protein 1 (GRA1) enthält (Scorza et al., 03). Auch gegen Protozoen, die weniger nahe verwandt sind, wurden DNA-Vakzine erfolgreich getestet. Beispielsweise konnte durch die DNA-Immunisierung von Mäusen mit dem immundominanten LACK-Gen eine Protektion gegen *Leishmania major*-Infektionen erzielt werden (Gurunathan et al., 97). Auch andere DNA-Immunisierungsstudien mit Virusantigenen ergaben Teilprotektionen gegen Belastungsinfektionen (Chang et al., 01; Fynan et al., 93; Kodihalli et al., 97; Robinson et al., 93). Es bleibt trotz der erzielten Erfolge festzustellen, dass die Immunisierungsstrategien weiter verbessert werden müssen. Beispielsweise ist anzunehmen, dass durch eine DNA-

Vakzinierung, die mit anderen Applikationsformen kombiniert wird, die sogenannte heterologe *prime-boost*-Methode, bessere Immunisierungserfolge erzielt werden könnten. Diese neueren Ansätze zeigten in Tiermodellen mit Malaria-vakzinen (Fynan et al., 93; Kodihalli et al., 97; Moorthy et al., 04b; Robinson et al., 93; Schneider et al., 98; Sedegah et al., 00) und anderen Impfstoffen (Hanke et al., 99; Robinson et al., 99), dass die Immunisierungen so viel effektiver gestaltet werden können. Beispielsweise konnte die T-Zellimmunogenität einer DNA-Vakzine mit dem TRAP-Gen von *P. falciparum* durch einen *boost* mit einem modifizierten *vaccinia virus Ankara* (MVA) erhöht werden (McConkey et al., 03).

Anstelle einer intramuskulären DNA-Injektion kommt auch die Nutzung einer *gene-gun* in Frage. Mit ihrer Hilfe kann die DNA-Menge um das 100-fache reduziert werden, um äquivalente Immunreaktionen hervorzurufen (Fynan et al., 93). Dabei ist jedoch zu beachten, dass sich die Immunantworten qualitativ unterscheiden können und nach einer *gene-gun*-Immunisierung eine verstärkte Th2-Antwort zu erwarten wäre (Feltquate et al., 97; Pertmer et al., 96). Neben diesen Th2-Antworten wurden mit der *gene-gun*-Immunisierung aber auch starke cytotoxische T-Zellantworten registriert (Barry und Johnston, 97; Pertmer et al., 95). Da die Methode gut reproduzierbare Resultate erzeugt und nur geringe DNA-Mengen benötigt werden, sollten in zukünftigen Studien auch die Verabreichung von Eimerien-DNA-Vakzinen mittels *gene-gun*-Methoden überprüft werden.

Wie schon dargestellt, handelt es sich bei Eimerieninfektionen um intestinale Erkrankungen, bei denen vermutlich die lokale mukosale Immunreaktion von entscheidender Bedeutung ist (Lillehoj, 98; Yun et al., 00). Es ist anzunehmen, dass die intramuskuläre Verabreichung von DNA oder Antigen nur einen suboptimalen Immunisierungserfolg im intestinalen Gewebe induziert. Obwohl intramuskuläre Immunisierungen mit DNA auch zu Veränderungen der T-Zellsubpopulation im Darm führen (Song et al., 00), sollte in zukünftigen Studien ein Hauptaugenmerk auf alternative DNA-Applikationsformen gelegt werden. Diese sollten zielgerichtet die Immunantwort des GALT ansprechen.

Gute Resultate konnten beispielsweise über die DNA-Applikation mit Chitosan-Nanopartikeln erreicht werden (Roy et al., 99). Dabei führten oral verabreichte DNA-Chitosan Partikel zur Genexpression von  $\alpha$ -Galaktosidase in intestinalen Epithelzellen. Des Weiteren gelang mit dieser Methode die

Immunisierung/Sensibilisierung von Mäusen mit dem Gen für das Erdnuß-Hauptallergen Arah2 und führte zur massiven Reduktion der Krankheitssymptome (Roy et al., 99).

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, die Aufnahme nackter Plasmid-DNA über M-Zellen zu erhöhen, um so direkt mukosale Immunantworten hervorzurufen. Dies kann über DNA-Komplexe geschehen, welche spezifische M-Zell-Liganden beinhalten, wie das *reovirus protein  $\sigma 1$*  (Wu et al., 01). M-Zellen sind für die professionelle Aufnahme von Antigenen in mukosalen Geweben verantwortlich. Sie transportieren die Antigene in Regionen weiter, in denen sie über APZ den T- und B-Zellen präsentiert werden. Über diese Methode kann direkt das mukosale Immunsystem angesprochen werden.

Auch virale Vektoren können für die mukosale Immunisierung eingesetzt werden (Morrow et al., 99). Es kommen verschiedene RNA- und DNA-Viren in Frage, die unterschiedliche Immunreaktionen induzieren. Erste erfolgreiche Versuche zur Vakzinierung von Hühnern wurden schon durchgeführt. Beispielsweise führt ein Kombinationsimpfstoff mit verschiedenen Eimerienantigenen, die in einem Tauben-Herpesvirus als Vakzine verabreicht wurden, zur verbesserten Gewichtsentwicklung nach Belastungsinfektion mit Eimerien (Vermeulen, 98; Vermeulen et al., 01).

Einen weiteren aussichtsreichen Ansatz bietet die genetische Immunisierung über bakterielle Vektoren. In Frage kommen verschiedene attenuierte Enterobakterien, wie beispielsweise unterschiedliche Listerien- oder Salmonellen-Stämme (Gentshev et al., 00). Diese attenuierten Bakterien können mit DNA-Vakzinen transformiert sein, die nach der Invasion der Wirtszelle durch Autolyse in das Zytoplasma abgegeben werden. Das heterologe Gen kann anschließend über den viralen (CMV) Promotor von der eukaryotischen Zelle exprimiert werden (Dietrich et al., 99; Medina und Guzman, 01). Ein Vorteil dieser Methode ist, dass beispielsweise Salmonellen und Listerien unter anderem APZ infizieren und aktivieren (Medina und Guzman, 01). Eine andere und schon häufiger angewandte Variante der bakteriellen Vakzinierung, ist die Applikation von attenuierten Bakterien, die das heterologe Antigen exprimieren. Durch Vakzinierung mit einem attenuierten *S. typhimurium*-Stamm, der das TB-Antigen ESAt-6 exprimiert und sekretiert, konnte so eine Reduktion der Bakterienlast erreicht werden (Mollenkopf et al., 01). Auch unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die Vakzinierung von Hühnern mit *S. typhimurium*, die das TA4- oder SO7-Protein exprimieren, zur Induktion einer eimerienspezifischen

Antikörperantwort führt (Pogonka et al., 03). Schutz konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Eine andere Arbeitsgruppe konnte durch Salmonellen-Vakzinierung eine Verbesserung der Gewichtszunahme nach Eimerieninfektionen erreichen (Vermeulen, 98; Vermeulen et al., 01).

Ein weiterer möglicher Ansatz wäre die Immunisierung mit attenuierten transgenen Parasiten, die Eimerienantigene exprimieren. Hierfür kommt vor allem der Modellorganismus *T. gondii* in Frage. Für diesen verwandten Apikomplexa-Parasiten stehen etablierte Transfektionssysteme zur Verfügung, die eine stabile genomische Integration von Fremd-DNA ermöglichen (Kim und Weiss, 04). Dass diese Methode erfolgversprechend angewendet werden kann, zeigt eine Studie mit attenuierten *T. gondii*-Parasiten (Stamm ts-4), die das *Leishmania major*-Antigen KPM-11 exprimieren (Ramirez et al., 01). Nach Immunisierung von Mäusen mit derart manipulierten *T. gondii* konnten KPM-11-spezifische T-Zellproliferationen detektiert werden. Des Weiteren wurde eine reduzierte Fußballen-Schwellung nach Belastungsinfektion mit *L. major* registriert. Ein weiterer Aspekt dieser Methode ist der Adjuvans-Effekt, der durch die *T. gondii*-Parasiten vermittelt wird. Ähnlich wie Eimerien induziert *T. gondii* eine breite zelluläre Immunreaktion, die sowohl CD8<sup>+</sup>- als auch CD4<sup>+</sup>-T-Zellantworten einschließt (Kasper et al., 04).

Um einen erfolgreichen Impfstoff gegen Eimerieninfektionen zu entwickeln, sollte neben der Suche nach möglicherweise effizienteren Impfstoffapplikationen auch die weitere Identifizierung von neuen protektiven Eimerienantigenen im Vordergrund stehen. Einige Aspekte hierzu wurden bereits in Kapitel 3.1 diskutiert. Da zur Zeit noch keine herausragende Antigene identifiziert werden konnten, sollten auch hier neue Wege eingeschlagen werden. Ein Ansatz könnte sein, genomische Eimerien-DNA- oder cDNA-Bibliotheken als DNA-Impfstoffe einzusetzen. Über aufeinanderfolgende Immunisierungen könnten so möglicherweise wenige protektive Antigene isoliert werden. Beispielsweise wurden solche Versuche mit Teilerfolgen schon bei *Mycoplasma ssp.*, *Leishmania donovani* und *Plasmodium chabaudi* durchgeführt (Barry et al., 95; Melby et al., 00; Moore et al., 01; Rainczuk et al., 03; Smooker et al., 00).

Anstatt auf Sequenzen oder rekombinante Proteine zurückzugreifen und diese zu testen, wäre es auch erfolgversprechend in umgekehrter Reihenfolge vorzugehen.

Beispielsweise könnten protektive T-Zellklone von reinfizierten Tieren isoliert und damit das zugrunde liegende Antigen identifiziert werden. Beispielsweise konnten mit einem solchen Verfahren zwei rekombinante Antigene von *Mycobacterium leprae* identifiziert werden, die von einem Pool aus acht humanen T-Zellklonen erkannt wurden (Mustafa et al., 98).

Zur Zeit lässt sich keine Aussage darüber machen, welche Immunisierungsstrategie in Zukunft am schnellsten zum Erfolg führen könnte. Ein Grund hierfür ist, dass die dem Immunschutz gegen Eimerieninfektionen zugrunde liegenden Mechanismen noch ungeklärt sind. Zukünftige Studien mit dem Ziel eine rekombinanten Eimerienimpfstoff zu entwickeln, sollten deshalb auch verstärkt die Aufklärung dieser immunologischen Reaktionen im Blickfeld haben.

### **3.3 Résumé**

Mit der Identifizierung sekretorischer Proteine von *E. tenella* stehen weitere potentielle Impfstoffkandidaten zur Verfügung, die in zukünftigen Immunisierungsstudien auf ihr protektives Potential hin überprüft werden sollten.

Insbesondere die Etablierung und Anwendung des experimentellen Ansatzes zur Identifizierung von Eimerienantigenen könnte in zukünftigen Studien dazu beitragen, dass weitere unbekannte sekretorische Moleküle identifiziert werden. Vorstellbar wäre die Testung von komplexen cDNA-Banken aus Sporozoiten oder anderen frühen Entwicklungsstadien. Auch könnten stadienspezifische sekretorische Moleküle durch die Anwendung von substrahierten cDNA-Banken identifiziert werden. Zusätzlich wäre die Analyse von cDNA-Banken anderer hochpathogener Eimerienarten von großem Nutzen, beispielsweise zur Identifizierung kreuzprotektiver Antigene.

Die zukünftige Anwendung der bioinformatischen Methode mit neuem Sequenzmaterial, wie etwa aus dem *E. tenella*-Genomprojekt, kann ebenso einen Beitrag zur schnellen Erkennung von sekretorischen Molekülen leisten. Die gefundenen Proteinhomologen von *E. tenella*-Sequenzen geben einen guten Hinweis auf deren wahrscheinliche Lokalisierung und Funktion. Genauere Analysen müssten dies jedoch noch für die einzelnen Moleküle bestätigen.

Obwohl hinsichtlich der Immunisierung von Hühnern mit unterschiedlichen

rekombinanten Eimerienimpfstoffen einige Erfolge zu verzeichnen sind, reichen die Resultate nicht an die der Lebendimpfstoffe heran. Vermutlich ist auch in Zukunft nicht zu erwarten, dass ein einziges Antigen einen kompletten Immunschutz gegen Eimerieninfektionen hervorrufen kann. Deshalb sollten weitere Studien auf die Nutzung komplexer Impfstoffe hinarbeiten, die mehrere teilprotektive Antigene enthalten. Auch die Erkenntnisse, die in dieser Arbeit gewonnen wurden zeigen, dass die Basis solcher Impfstoffe DNA-Vakzinen sein könnten. Jedoch sollte dabei die Induktion der lokalen intestinalen Immunantwort durch mukosale DNA-Applikation im Vordergrund stehen. Es sollten auch *prime-boosting*-Strategien in Betracht gezogen werden, bei denen zur Steigerung der Immunantwort verschiedene Impfstoff-Applikationenformen kombiniert werden.

## 4 Methoden

### 4.1 Gewinnung von Parasitenmaterial

#### 4.1.1 Passagierung von *E. tenella* in Hühnern und Gewinnung von Oozysten

Die Passagierung von *E. tenella* in Hühnern dient der Produktion von Parasitenmaterial. Um gleichbleibend infektiöse Oozysten zu erhalten, sollten Passagierungen alle 3 bis 9 Monate durchgeführt werden (Shirley, 95).

Hühner im Alter von 3 Wochen wurden je mit 30000 *E. tenella* Oozysten oral über eine Schlundsonde infiziert. Die Sektion der Versuchstiere und die Entnahme der Blinddärme erfolgte 7 Tage nach der Infektion. Zur Isolierung der Oozysten wurde das Blinddarmgewebe kräftig in H<sub>2</sub>O ausgeschüttelt und der Darminhalt mit Mörser und Pistill homogenisiert. Zur Reinigung der Oozysten erfolgten drei Sedimentationen in H<sub>2</sub>O. Anschließend konnte das Sediment in 2% Kaliumbichromat aufgenommen werden. Die Oozystensporulation erfolgte für 3 Tage bei Raumtemperatur (RT) und leichtem Schütteln. Mit Hilfe der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer wurde die Sporulationsrate und Oozystenkonzentration ermittelt. Die Lagerung der Suspension erfolgte bei 4°C.

#### 4.1.2 Gewinnung reiner *E. tenella*-Sporozoiten

Je Sporozoitenaufreinigung sollten nicht mehr als  $3 \times 10^7$  sporulierte Oozysten eingesetzt werden. Die Sterilisation der Oozysten erfolgte mit 200 ml NaOCl (13 %) für 15 Minuten (min) unter Rühren. Anschließend konnten die Oozysten in 50 ml-Portionen für 8 min flotiert (1100 g) werden. Die Oozysten die sich in der obersten Schicht des Überstand (ÜS) befanden, wurden abgenommen und dreimal mit 50 ml sterilem H<sub>2</sub>O für 8 min gewaschen (1600 g).

Das sterilisierte Oozystenpellet wurde in 10 ml vorgewärmten Hank's-Puffer aufgenommen und mit 30 g sterilen Glasperlen versetzt. Durch kräftiges Schütteln für 15 Sekunden (sec) konnten die Oozystenhüllen mechanisch zerstört werden. Der ÜS wurde entnommen und die Sporozysten für 5 min pelletiert (800 g). Das Pellet wurde anschließend in 7,5 ml Hank's-Puffer aufgenommen.

Um die Sporozoiten freizusetzen, wurden der Sporozystensuspension 12,5 ml vorgewärmtes Exzystierungsmedium zugesetzt und der Ansatz im Wasserbad für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Sporozoiten für 10 Minuten zentrifugiert (1600 g) und das Sporozoitenpellet in Phosphatpuffer/Glukose-Lösung aufgenommen.

Die Reinigung der Sporozoiten erfolgte über eine vorbereitete DE52-Anionenaustauschchromatographie-Säule (Schmatz et al., 84). Zur Herstellung der Säule wurden in einer 30 ml-Einmalspritze Glaswolle (0,5 cm), Nylonwolle (3-5 cm) und DE52-Zellulose (5 cm) übereinander geschichtet. Die DE52-Zellulose wurde einen Tag zuvor zweimal in Phosphatpuffer für 1 h gewaschen und anschließend der pH-Wert auf 8,0 eingestellt. Die Lagerung der Suspension erfolgte bei 4°C. Die Sporozoiten konnten mit 300 ml Phosphatpuffer/Glukose-Lösung aus der Säule ausgewaschen werden. Der Durchfluss enthielt ultrareine Sporozoiten, die anschließend für 10 min pelletiert (1600 g) werden konnten. Die Ermittlung der Zellzahl erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer.

#### **4.1.3 Bestimmung der Oozystenanzahl im Fäzes infizierter Tiere**

Zur Bestimmung der Gesamt-Oozystenausscheidung wurde der Fäzes infizierter Tiere von Tag 5 bis 10 nach der Infektion täglich eingesammelt, gewogen und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert. Aufgrund haltungstechnischer Bedingungen wurde der Kot von Tiergruppen als Fäzes-Pool gesammelt.

Der gesammelte Fäzes wurde entweder komplett in 5 Liter (l) H<sub>2</sub>O homogenisiert oder drei repräsentative Aliquots (5 g) in 50 ml-Plastikröhrchen überführt und mit 50 ml H<sub>2</sub>O resuspendiert. Die Suspension wurde mit gesättigter NaCl-Lösung vermischt (1:10 oder 1:20) und die Oozystenanzahl in einer MacMaster-Flotations-Zählkammer ermittelt. Jede Probe wurde mindestens dreimal ausgezählt und aus dem Mittelwert unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors die Gesamt-Oozystenanzahl berechnet.

#### **4.2 Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli*-Zellen**

Die Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen wurde nach dem Protokoll von Inoue et al. (1990) durchgeführt.



250 ml SOB-Medium wurden mit einer Bakterienkolonie angeimpft und auf dem Schüttelinkubator bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 bei 18°C kultiviert. Die Kultur wurde für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend für 10 min bei 4°C pelletiert (2500 g). Die Bakterien wurden in 80 ml eiskaltem Transformationspuffer resuspendiert und für weitere 10 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 20 ml Transformationspuffer aufgenommen und mit 7% Dimethylsulfoxid (DMSO) versetzt. Nach einer 10-minütigen Inkubation auf Eis wurden Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Je nach Transformationsansatz wurden 200 µl kompetente *E. coli*-Zellen mit 10-50 ng Plasmid-DNA oder 1- 10 µl Ligationsansatz gemischt und in einem Polypropylen-Röhrchen für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 30 sec bei 42°C und anschließender 1-minütiger Inkubation auf Eis, erfolgte die Zugabe von 800 µl SOC-Medium. Die Ansätze wurden für 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend 50 - 200 µl auf Selektionsagarplatten mit entsprechenden Antibiotikumzusatz ausplattiert.

#### **4.2.1 Identifizierung rekombinanter Bakterienklone**

Blau/Weiß-Screening: Systeme die zur \_-Komplementierung geeignet sind, wurden nach der Transformation auf LB-Platten mit XGal (40 µg/ml) und Isopropyl-thio-β-D-Galactopyranosid (IPTG) (40 µg/ml) aufgebracht. Nach Kultivierung erschienen Transformanten mit gewünschtem Insert als weiße Kolonien, während negative Klone als blaue Kolonien detektiert werden konnten.

Restriktionsanalyse: Von einzelnen Kolonien wurden über-Nacht (ÜN)-Kulturen angeimpft, die Plasmid-DNA aufgereinigt und anschließend mit Restriktionsenzymen analysiert.

Kolonie-PCR: Einzelne Klone wurden mit einem sterilen Zahnstocher aufgenommen und in 20 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert. Davon wurden 1 µl in die PCR eingesetzt.

#### **4.2.2 Langzeitlagerung von *E. coli*-Zellen**

Aus einer ÜN-Kultur wurde die Bakteriensuspension mit Hogness-Einfriermedium versetzt (1:10), in einem Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff eingefrohren und bei -80 °C gelagert.

### 4.3 Transformation von *S. cerevisiae*-Zellen mit Plasmid-DNA

Die Herstellung kompetenter Hefezellen und deren Transfektion wurde nach der Lithiumacetat-Methode durchgeführt (Ausubel et al., 95).

300 ml YPD-Medium wurden mit 5 µl einer Hefe-Vorkultur angeimpft und bei 30°C inkubiert, bis der Ansatz eine OD<sub>600</sub> von 0,5 erreicht hatte. Anschließend erfolgte für 5 min eine Zentrifugation (4000 g). Das Pellet wurde in 10 ml reinstem MilliQ-H<sub>2</sub>O resuspendiert und nochmals für 5 min pelletiert (5000 g). Die Zellen wurden in 1,5 ml frisch angesetzter Lithiumacetatlösung resuspendiert. Derart hergestellte Hefezellen bleiben einige Tage kompetent und können bei 4°C gelagert werden.

Pro Transformation wurden 200 µg *carrier-DNA* mit 1 ng - 5µg Plasmid-DNA vermischt. Der Ansatz wurde anschließend mit 200 µl kompetenten Hefezellen versetzt. Nach Zugabe von 1,2 ml frisch angesetzter Polyethylenglycol (PEG)-Lösung wurden die Zellen für 30 min bei 30°C inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 15 min bei 42°C erfolgte die Aufnahme der pelletierten Zellen in 200 µl frisch angesetzten TE-Puffer. Bis zu 200 µl Transfektionsansatz wurden auf entsprechenden *complete minimal* (CM)-*drop out*-Platten ausplattiert und bei 30°C inkubiert.

Zur Herstellung der *carrier-DNA* wurde Lachshoden-DNA in TE-Puffer (10 mg/ml) bei 4°C gelöst. Der Ansatz wurde im Sonikator (75 % Leistung) aufgeschlossen, bis die Viskosität der Lösung leicht abnahm. Die DNA sollte zwischen 2 und 15 kb fraktioniert sein. Anschließend wurde der Ansatz mittels Phenol/Chloroform-Extraktion gereinigt, mit Ethanol präzipitiert und in TE-Puffer (10 mg/ml) gelöst. Aliquots wurden bei -20°C gelagert.

#### 4.3.1 Langzeitlagerung von Hefezellen

Aus einer ÜN-Kultur wurden Hefezellen mit 2 x Einfriermedium (1:1) gemischt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

## 4.4 Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren

### 4.4.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

#### Isolierung mittels Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)-Präparation (Del Sal et al., 88)

Von einer *E. coli*-Kultur wurden 1 bis 5 ml abzentrifugiert und die Zellen in 200 µl STET-Puffer resuspendiert. Nach der Zugabe von frisch angesetzter Lysozymlösung (1 mg/ml) wurde der Ansatz für 5 min inkubiert, anschließend für 45 sec aufgekocht und dann für 10 min abzentrifugiert (15000 g). Das Pellet aus aggregierter chromosomaler DNA und Proteinen konnte mit einem Zahnstocher entfernt werden. Die RNA wurde durch Zugabe von RNase (250 µg/ml) und Inkubation für 10 min bei 65°C entfernt. Die Plasmid-DNA konnte anschließend durch Zugabe von 10 µl CTAB-Lösung und 5-minütiger Zentrifugation (15000 g) präzipitiert werden. Das Präzipitat wurde in 1,2 M NaCl gelöst und die Plasmid-DNA selektiv mit Ethanol ausgefällt und die DNA in H<sub>2</sub>O oder TE aufgenommen.

#### Minipräparation und Maxipräparation von Plasmid-DNA mittels Anionenaustauschchromatographie-Säulen (Fa. Clontech)

Die Methode dieser kommerziellen Kits basiert auf der alkalischen Lyse der Bakterien (Birnboim und Doly, 79) und der Aufreinigung von Plasmid-DNA über Anionenaustauschchromatographie-Säulen. Nach Pelletierung der ÜN-Bakterienkultur wurde die Lyse und Aufreinigung nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Für Miniprep-Säulchen wurden in der Regel 5 bis 8 ml Bakterien-Kultur verwendet und für Maxipräparationen 500 ml Bakterienkultur.

### 4.4.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefen

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA als PCR-Vorlage wurde eine Schnelllyse durchgeführt. Hierzu wurden 5 µl Hefekultur mit 20 µl Lysepuffer I versetzt und für 10 min bei 100°C inkubiert. Für die PCR-Reaktion wurden 3 µl Hefelysat eingesetzt.

Die Aufreinigung größerer Mengen Plasmid-DNA aus bis zu 5 ml ÜN-Kultur erfolgte

durch die Zugabe von 200 µl Lysepuffer II und 200 µl Glasperlen zum Hefepellet. Der Ansatz wurde 1 min kräftig gevortext und mit 200 µl Phenol/Chloroform extrahiert. Die DNA wurde mit Ethanol präzipitiert und anschließend in H<sub>2</sub>O aufgenommen.

#### **4.4.3 Isolierung von Ribonukleinsäuren**

Die Isolierung von Gesamt-RNA wurde mit der gebrauchsfertigen Extraktionslösung peqGOLD RNAPure (peqLab, Erlangen) nach Herstellerangaben durchgeführt.  $5 \times 10^8$  *E. tenella* Sporozoiten oder  $1 \times 10^6$  COS-7-Zellen wurden 1 ml RNAPure-Lösung zugesetzt und für 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform wurde der Ansatz kräftig geschüttelt und für 10 min bei 4°C zentrifugiert (12000 g). Die RNA in der oberen wässrigen Phase wurde mit Isopropanol präzipitiert und in RNase-freien H<sub>2</sub>O gelöst. Um DNA-Kontaminationen zu vermeiden, wurde für RT-PCR-Reaktionen die RNA vor Zugabe mit DNase verdaut.

Die Isolierung von mRNA aus Gesamt-RNA oder *E. tenella*-Sporozoiten wurde mittels Dynabeads® Oligo (dT)<sub>25</sub> und mRNA-DIRECT-Kit (Dyna, Norwegen) nach Vorschrift des Herstellers durchgeführt. Der überwiegende Anteil der mRNA ist mit einem Polyadenosin (PolyA)-Schwanz ausgestattet. Diese PolyA-Sequenzen binden an Oligothymidinmoleküle, die an eine Trägersubstanz gekoppelt sind. Da die Trägersubstanz mit Magnetfeldern in Wechselwirkung tritt, kann die mRNA leicht aus der Suspension isoliert werden. Durch Temperaturerhöhung ist die Bindung wieder auflösbar. Je Extraktionsschritt wurden entweder 100 µg Gesamt-RNA oder  $1 \times 10^9$  *E. tenella*-Sporozoiten eingesetzt. Die RNA wurde mit RNase-freien H<sub>2</sub>O eluiert und bis zur weiteren Verwendung in 75%-igem Ethanol bei -80 °C gelagert.

#### **4.4.4 Isolierung von DNA aus Agarosegelen**

##### Elektroelution mittels Biotrap-Kammer

Die Biotrap-Kammer (Schleicher und Schüll, Dassel) wurde entsprechend der Herstellerangaben mit Membranen versehen und in eine mit TBE-Puffer gefüllten Elektrophoresekammer gestellt. Die ausgeschnittenen Gelstücke wurden in die dafür vorgesehene Kammer eingebracht und die DNA für 4 h bei 200 V extrahiert. Nach der Elektroelution wurde der Strom für etwa 20 sec umgepolt und die DNA-

Fragmente aus der entsprechenden Kammer entnommen. Die DNA wurde mittels Phenol/Chloroform-Extraktion gereinigt und mit Ethanol präzipitiert.

#### Absorption von DNA an Glasperlen (NucleoTrap®-Methode)

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde der kommerzielle Kit NucleoTrap® (BD Bioscience Clontech, Heidelberg) nach Herstellerangaben verwendet.

Die entsprechenden DNA-Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten und mit Natriumjodid-haltigem Puffer und Glasmilchmatrix versetzt. Durch Inkubation für 15 min bei 50°C, wurde die DNA in Lösung gebracht. Die Matrix mit der gebundenen DNA wurde jeweils zweimal mit ethanolhaltigen Waschpuffern gewaschen und anschließend getrocknet. Die DNA wurde mit H<sub>2</sub>O von den Glaspartikeln gelöst.

#### **4.4.5 Reinigung von Nukleinsäurelösung mittels Phenol/Chlorophorm-Extraktion**

Die Entfernung von Proteinen aus Nukleinsäurelösungen erfolgte mit äquilibrierten Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (P/C/I) (25:24:1) bei einem pH-Wert von 6,5 bis 7,5.

Die zu reinigende Nukleinsäurelösung wurde mit gleichem Volumen einer P/C/I-Lösung versetzt und gemischt. Die Phasentrennung erfolgte während einer 3-minütigen Zentrifugation (12000 g). Die obere, wässrige Phase wurde abgenommen und bei Bedarf durch Zugabe des gleichen Volumens Chloroform erneut extrahiert und anschließend mit Ethanol präzipitiert.

#### **4.4.6 Konzentrieren von Nukleinsäuren (Ethanolpräzipitation)**

Als Standardmethode zur Fällung von Nukleinsäuren wurde die Ethanolpräzipitation mit Natriumacetat oder Ammoniumacetat eingesetzt.

Hierzu wurden zur Nukleinsäurelösung Natriumacetat (0,3 M) oder Ammoniumacetat (1 M) zugesetzt und mit 2 Volumen eiskaltem Ethanol gemischt. Zur Fällung von geringen RNA-Mengen erfolgte die Zugabe von 1µg Glykogen. Nach 2 h Inkubation (-20°C) konnte das Präzipitat für 30 min bei 4°C pelletiert werden (12000 g). Nach einem weiteren Waschschrift mit 70 % Ethanol wurde das Pellet getrocknet. Die Resuspendierung der DNA oder RNA erfolgte in TE oder H<sub>2</sub>O.

#### **4.4.7 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte mittels photometrischer Messung bei OD<sub>260</sub>. Einem OD<sub>260</sub>-Wert von 1 entsprechen ca. 50 µg/ml Doppelstrang-DNA und etwa 35 µg/ml RNA. Zusätzlich wurde die Reinheit der Lösung durch die Ermittlung des OD<sub>280</sub>-Wertes bestimmt, wobei der Quotient OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> zwischen 1,8 und 1,9 liegen sollte. Niedrigere Werte weisen auf Proteinverunreinigungen hin.

### **4.5 Analyse und enzymatische Veränderungen von Nukleinsäuren**

#### **4.5.1 Agarose-Gelelektrophorese**

Die Agarose-Gelelektrophorese ermöglicht es, DNA aufgrund ihrer unterschiedlichen Molekülmassen und der dadurch bedingten Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld aufzutrennen. Durch den Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid, der in die DNA interkaliert, kann die aufgetrennte DNA sichtbar gemacht werden (Anregung bei 250 - 300 nm). Die DNA-Lösung wurde mit Probenpuffer (1:10) versetzt und in einem 0,5 bis 1,5 % Agarosegel mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid im elektrischen Feld (80 V) aufgetrennt.

#### **4.5.2 Restriktionsverdau von DNA**

Mittels Restriktionsendonukleasen kann DNA spezifisch gespalten werden, was der Klonierung und Analyse von DNA dient. Die Reaktionsbedingungen, wie eingesetzte Enzymmengen und Pufferbedingungen, entsprachen den Herstellerangaben.

#### **4.5.3 Ligation von DNA-Fragmenten**

Die DNA-Ligase katalysiert die kovalente Verknüpfung einer freien 5'-Phosphatgruppe und einer freien 3'-Hydroxylgruppe. Sollten DNA-Fragmente in einen geschnittenen Vektor eingesetzt werden, wurde ein Vektor:Insert-Verhältnis von 3:1 gewählt.

Standardreaktion für die Ligation:

Vektor-DNA	50-100 ng
Fragment-DNA	variabel 5-100 ng
10 x Ligasepuffer	2 µl
T <sub>4</sub> -DNA-Ligase	3 U
H <sub>2</sub> O	ad 20 µl

Die Ligation erfolgte ÜN bei 16°C. Für die Transformation von Bakterien wurden 1-10 µl Ligationsansatz eingesetzt.

#### 4.5.4 Phosphorylierung von Nukleinsäuren

Die Phosphorylierung von nicht-phosphorylierten 5'-DNA-Enden ist erforderlich, um eine Ligation zu ermöglichen.

Standardreaktion für die Phosphorylierung:

DNA	1 - 5 µg
5 x Polynukleotidkinase-Puffer	4 µl
T <sub>4</sub> - Polynukleotidkinase	10 - 30 U
H <sub>2</sub> O	ad 20 µl

Die Phosphorylierung erfolgte für 30 min bei 37°C.

#### 4.5.5 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzanalyse wurde auf der Grundlage der Didesoxymethode durchgeführt (Sanger et al., 77). Das Verfahren beruht darauf, dass ein Oligonukleotid an einer Matrix-DNA enzymatisch verlängert wird, wobei durch die Zugabe von Didesoxynukleotiden gleichmäßig verteilte Kettenabbrüche erzeugt werden. Die einsträngigen DNA-Fragmente können anschließend mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) aufgetrennt werden. Für die Sequenzierungen wurde der Sequenase-Kit (Pharmacia, Freiburg) in Verbindung mit Cy5-markierten Primern verwendet, der eine nicht-radioaktive Sequenzierung ermöglicht.

Je Sequenzierungsansatz wurden Plasmid-DNA (1 - 5 µg) oder unaufgereinigtes PCR-Produkt (200 ng/1kb) mit Cy5 markierten Primer (2 µM) und 1 µl Sequenziermix versetzt. Das Endvolumen pro Ansatz betrug 8 µl. Im Thermocycler (MJ Research,

USA) erfolgte die Sequenzierreaktion unter folgenden Bedingungen:

97°C	4:30 min
96°C	0:30 min
55-60°C	0:30 min
72°C	0:30 min; insgesamt 24 Zyklen.

Nach Zugabe von 6 µl Ladepuffer wurden die Ansätze auf das Sequenziergel aufgetragen und die PCR-Fragmente entsprechend den Herstellerangaben im ALFexpress-Sequenziergerät (Pharmacia, Freiburg) aufgetrennt. Die automatisierte Sequenzanalyse erfolgte mit der ALF-Computersoftware (Pharmacia, Freiburg). Nicht erkannte Signale wurden manuell editiert.

#### **4.5.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Die PCR ist eine Methode zur Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen, bei der die DNA-Replikation nachgeahmt wird. Die PCR wird meist in drei Schritten durchgeführt, die sich in genau definierten Zyklen wiederholen. Nach der Denaturierung der Doppelstrang-DNA mit Hilfe von Hitze, folgt die Anlagerung der zwei Oligonukleotide (Primer) an definierte Sequenzabschnitten, die den zu amplifizierten Bereich einschließen. Im dritten Schritt erfolgt die Kettenverlängerung der Nukleinsäuresequenz.

Standardreaktion der PCR:

DNA-Matrize	1-5 µl (variierende Konzentrationen)
5'Primer	1-2 µl (10-20 pmol)
3'Primer	1-2 µl (10-20 pmol)
MgCl <sub>2</sub>	3 µl (50 mM)
10 x PCR-Puffer	5 µl
Taq-Polymerase	1 µl (5 U/µl)
H <sub>2</sub> O	ad 50 µl

Die Standardbedingungen der PCR-Reaktion umfassten einen ersten Denaturierungsschritt für 3 min bei 94°C gefolgt von 30 - 35 Reaktionszyklen. Jeder Zyklus bestand aus 1 min Denaturierung bei 94°C, 1 min Primer-Anlagerung bei 55 - 65°C und der Primer-Verlängerung für 0:30 - 1:30 min bei 72°C. Anschließend



erlaubt eine 7-minütige Inkubation bei 72°C die vollständige Verlängerung aller DNA-Kopien. Die Bedingungen variieren nach erwarteter Länge des DNA-Produktes und der spezifischen Primerbindungstemperatur.

#### 4.5.7 Reverse Transkription (RT)

Mittels RT kann RNA in DNA umgeschrieben werden, wobei einzelne cDNA-Stränge entstehen. Diese können entweder direkt in eine nachfolgende PCR eingesetzt werden, oder zur Herstellung von Doppelstrang-cDNA genutzt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde auf eine M-MLV-Reverse Transkriptase zurückgegriffen.

Standardreaktion der RT:

Gesamt-RNA oder mRNA	1 - 10 µg
Primer	200 ng - 1 µg
5 x Puffer	5 µl
dNTP	5 mM
M-MLV-RT	200 - 1000 U
H <sub>2</sub> O	ad 25 µl

In den ersten 10 min erfolgte die Inkubation mit PolyA-Primern bei 40°C und mit Zufallsprimern bei RT, danach wurde der Ansatz für 50 min bei 40°C weiter inkubiert. Die Reaktion wurde durch Erhitzen für 15 min bei 70°C beendet.

#### 4.5.8 Zweitstrang-cDNA-Synthese

Die Erzeugung von Doppelstrang-DNA nach einer RT kann mit der *E. coli*-DNA-Polymerase I durchgeführt werden. Die Reaktion wurde dabei durch Zugabe von *E. coli*-DNA-Ligase und *E. coli*-RNase H optimiert.

Standardreaktion der Zweitstrang-cDNA-Synthese:

RT-Ansatz	20 µl
5 x Zweitstrang-Puffer	30 µl
dNTP	1 mM
<i>E. coli</i> -DNA-Polymerase I	40 U
<i>E. coli</i> -DNA-Ligase	10 U
<i>E. coli</i> -RNase H	2 U
H <sub>2</sub> O	ad 150 µl

Die Inkubation des Ansatzes erfolgte für 2 h bei 16°C. Um stumpfe DNA-Enden zu erzeugen, wurden anschließend dem Ansatz 10 U T4-DNA-Polymerase zugesetzt und die Reaktion für weitere 5 min bei 16°C fortgesetzt.

#### **4.6 Herstellung einer cDNA-Bank aus *E. tenella*-Sporozoiten**

Zur Herstellung der cDNA-Bank wurde ein cDNA-Synthese-Kit (GibcoBRL, Karlsruhe) verwendet und die von Jacobs et al. (1999) beschriebenen Veränderungen vorgenommen.

Die Sporozoiten-mRNA wurde mit einem Zufallsprimer, der um eine XhoI-Schnittstelle verlängert war, in einer RT-Reaktion eingesetzt. Anschließend folgte die Zweitstrangsynthese. Nach den beiden Reaktionen wurden die Proteine durch Phenol/Chloroform-Extraktion aus dem Reaktionsansatz entfernt und die cDNA mit Ammoniumacetat und Ethanol präzipitiert. Anschließend erfolgte die Adapterligation und Phosphorylierung der cDNA-Enden. Um die gerichtete Klonierung in den Zielvektor pSUC2 zu ermöglichen, wurde die cDNA mit dem Restriktionsenzym XhoI geschnitten und danach mit Phenol/Chloroform extrahiert und mit Ammoniumacetat und Ethanol präzipitiert. Die Analyse erfolgte im Agarosegel.

#### **4.7 Identifizierung von sekretorischen Proteinen mittels Hefemutanten (*suc2<sup>-</sup>*, *trp<sup>-</sup>*) und Invertaseaktivitätstest**

Nach der Hefetransfektion der *E. tenella*-cDNA-Bank (im Vektor pSUC2) in den Hefestamm YTK12 (*suc2<sup>-</sup>*, *trp<sup>-</sup>*) erfolgte zunächst die Identifizierung positiver Hefetransfektanten auf *complete minimal dextrose medium without tryptophane* (CMD-W)-Agarplatten. Aufgrund der Defizienz in der Aminosäuresynthese von Tryptophan, teilen sich lediglich Transfektanten, die über das eingebrachte Plasmid die Tryptophansynthese komplementieren. Die Inkubation erfolgte bei 30°C. Nachdem sichtbare Kolonien gewachsen waren, erfolgte die Überführung der Kolonien mit einem Stempel auf YPRAA-Agarplatten und eine weitere Inkubation für 7 Tage bei 30°C. Antimycin A im Medium führte zu anaeroben Bedingungen und inhibierte das Wachstum von Hefezellen, die keine Invertase sekretieren. Um die Rate an falsch-positiven Resultaten zu minimieren, wurden die positiven Klone erneut auf YPRAA-Agarplatten ausgestrichen.

Eine weitere Möglichkeit zum Nachweis der Invertasesekretion besteht darin, die extrazelluläre Aktivität des Enzyms über die Spaltprodukte Glukose und Fruktose zu ermitteln (Vitolo und Borzani, 83). Das Enzym spaltet nicht-reduzierende Oligosaccharide wie Saccharose in reduzierende Monosaccharide, die im ÜS nachweisbar sind. Für den Test wurden die Hefezellen bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1 kultiviert. 2,5 ml Hefekultur wurden pelletiert und in 1 ml H<sub>2</sub>O aufgenommen. 750 µl Zellsuspension wurden mit 750 µl gepufferte Saccharoselösung gemischt und der Ansatz für 15 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden pelletiert und 100 µl ÜS mit 900 µl Entwicklungslösung versetzt. Ein Farbumschlag zeigt den Nachweis von reduzierenden Zuckern im ÜS an.

#### **4.8 Expression und Aufreinigung rekombinanter *E. coli*-Proteine**

Die cDNA der *E. tenella*-Proteine SO7, TA4 und EtMIC1 wurden in den Vektor pQE-30 kloniert und in *E. coli*-XL1-Blue transformiert. Die Konstrukte lagen zu Beginn der Arbeiten bereits vor. Die pQE-30-Plasmide (Stüber et al., 90) besitzen einen IPTG-induzierbaren Promotor (lac-Operon), wodurch die Genexpression der rekombinanten Proteine ausgelöst wird.

Eine ÜN-Kultur wurde in LB-Medium 1:20 verdünnt und bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 inkubiert. Nach Zugabe von 2 mM IPTG erfolgte eine weitere Inkubation für 3 h. Die Bakteriensuspension wurde für 10 min bei 4°C pelletiert (4000 g) und die Bakterien in Lysepuffer A (5 ml/g Pellet) für 1 h auf Eis inkubiert. Nach einer 20-minütigen Zentrifugation bei 4°C (12000 g) wurde der ÜS mit 1 ml Nickel-Chelat-Matrix (Qiagen, Hilden) versetzt und der Ansatz ÜN bei 4°C inkubiert. Die Matrix mit den gebundenen Proteinen wurde auf eine Säule gegeben. Die Waschschrte erfolgten mit 20 ml Puffer B und 20 ml Puffer C. Die Proteinelution erfolgte mit 15 ml Puffer E. Die Proteinlösungen wurden stufenweise über absteigende Harnstoffkonzentrationen gegen PBS dialysiert und die Proteinkonzentration mit dem BCA-Test bestimmt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Aliquots bei -20°C aufbewahrt.

## **4.9 Proteinanalytik**

### **4.9.1 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)**

Die SDS-PAGE erlaubt eine reproduzierbare biochemische Charakterisierung und Analyse von Proteinen durch Auftrennung im elektrischen Feld (Laemmli, 70). Die Proteinauftrennung erfolgt nahezu auf Basis der Proteingröße. Die einzelnen aufgetrennten Proteine können unspezifisch (z.B. mit Coomassie-Blau) angefärbt werden, womit einzelne Proteinbanden bis zu einer Menge von 100 ng nachweisbar sind (Sambrook et al., 89).

Das Elektrophorese-System (Pharmacia, Freiburg) wurde laut Herstellerangaben zusammengebaut. Je nach erwarteten Molekulargewichten wurden Trenngele zwischen 8 bis 15 % Acrylamid benutzt.

Die Proteinproben wurden mit 2 x SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert und nach dem Auftragen bei einer Stromstärke von 15 mA elektrophoretisch aufgetrennt.

Zur Färbung der Proteine wurde das Trenngel für 1 h im Coomassie-Blau-Färbebad inkubiert und das Gel anschließend entfärbt. Zur weiteren Dokumentation erfolgte die Trocknung des Gels zwischen zwei Folien in einem Spannrahmen (Promega, Mannheim).

### **4.9.2 Elektrotansfer von gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteinen auf Nitrocellulose (NC)-Membranen**

Für die immunologische Charakterisierung von Proteinen mit spezifischen Antikörpern wurden die durch die SDS-PAGE aufgetrennten Proteine im elektrischen Feld auf ein festes Trägermaterial (NC) übertragen (Towbin et al., 92). Der Transfer wurde mit einer Semidry-Blot-Apparatur (LMS, Dossenheim) nach Herstellerangaben durchgeführt.

Zur Kontrolle des Transfers, konnten die übertragenen Proteine reversibel mit Ponceau-Färbelösung (10% Gebrauchslösung) für 10 min bei RT gefärbt werden. Die Proteinbanden wurden durch Waschen in PBS wieder entfärbt.

### **4.9.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels Bicinchroninsäure (BCA)-Test**

Der BCA-Test (Smith et al., 85) zeichnet sich durch eine hohe Sensitivität (bis 5 µg/ml Protein) und Kompatibilität mit vielen Pufferkomponenten aus. Im alkalischen Milieu bindet BCA an Protein-Kupfer-Komplexe und bildet dabei einen violetten Farbkomplex, der photometrisch erfasst werden kann.

Zur Ermittlung der Proteinkonzentration wurde eine Standardreihe von 50 bis 1200 µg/ml BSA hergestellt. In einer Mikrotiterplatte wurden 20 µl Proteinlösung mit 200 µl gebrauchsfertiger BCA-Lösung (Pierce, USA) gemischt. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei 37°C. Im Plattenphotometer erfolgte die Ermittlung der Extinktion bei 550 nm (Referenzwellenlänge 630 nm).

### **4.9.4 Kopplung von myc-Peptid an BSA**

Die kovalente Kopplung von Peptiden an Trägerproteine kann über freie Aminogruppen (z.B. Lysin) erfolgen.

Der Ansatz mit BSA, myc-Peptid und Glutaraldehyd (siehe Material) wurde für 90 min bei 37°C inkubiert und anschließend mit 125 µl 0,1 M NaBH<sub>4</sub> versetzt. Nach einer weiteren Inkubation für 15 min bei RT konnte das gekoppelte Peptid bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert werden.

## **4.10 Immunologische und zellbiologische Methoden**

### **4.10.1 Immunchemischer Nachweis von Proteinen auf NC-Membran**

Das immunchemische Nachweissystem für Proteine, die auf NC übertragen wurden, beinhaltet das spezifische Erkennen des Proteins durch Antikörper und die Detektion des gebundenen Antikörper durch einen zweiten Antikörper, der mit einem Enzym konjugiert ist. Nach Zugabe eines Enzymsubstrates erfolgt die Detektion der Spaltungsprodukte.

Zur Absättigung der nach der Proteinübertragung verbleibenden

Proteinbindungsstellen wurde die NC-Membran in Blockierungspuffer für 30 min bei RT inkubiert. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper erfolgte für 3 h. Nach drei Wasschsritten für 5 min erfolgte die Inkubation mit dem Antikörper-Enzym-Konjugat für 1 h. Die NC-Membran wurde erneut dreimal mit Waschpuffer für 5 min gewaschen. Schließlich wurde die Farbreaktion mit dem Enzymsubstrat durchgeführt, bis die gewünschte Farbintensität eintrat. Als Substrat für die alkalische Phosphatase (AP) wurde 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP) und Nitroblau-tetrazoliumchlorid (NBT) in AP-Puffer verwendet.

#### **4.10.2 ELISA**

Der ELISA bietet die Möglichkeit, antigenspezifische Antikörper quantitativ nachzuweisen. Hierzu wird das Antigen unspezifisch an die Festphase einer Mikrotiterplatte gebunden und anschließend mit dem Testserum inkubiert. Über ein Antikörper-Enzym-Konjugat, das den spezifisch gebundenen Antikörper erkennt, wird dann der Nachweis erbracht.

Das Antigen wurde in ELISA-Puffer I mit 5 µg/ml verdünnt und je 100 µl in die Reaktionskammern einer Mikrotiterplatte zugesetzt. Die Inkubation erfolgte ÜN bei 4°C. Nach dieser und jeder weiteren Inkubation folgten drei Waschschrte mit Waschpuffer. Von den Testseren wurden Verdünnungsreihen in ELISA-Puffer II hergestellt und je 100 µl in die Reaktionsgefäße zugegeben. Die Inkubation erfolgte für 90 min bei 37°C. Danach wurden 100 µl des zweiten Antkörpers oder des Enzym-Konjugates, verdünnt in ELISA-Puffer II, zugegeben und die Ansätze jeweils für 90 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 100 µl Substratlösung zugegeben und der Ansatz für 15-30 min bei 37°C inkubiert. Die Detektion der Farbreaktion erfolgte im Plattenphotometer bei einer Absorption von 405 nm (Referenz 450 nm). Die Resultate wurden entweder als reine Absorptionswerte angegeben oder die Antikörperkonzentration wurde als Endpunkttiter dargestellt (Venkatesan und Wakelin, 93).

#### **4.10.3 Isolierung und Aufreinigung von PBL und Milzzellen von Hühnern**

In der vorliegenden Arbeit wurden zur Überprüfung der zellulären Immunantwort PBL in T-Lymphozyten-Transformationstests eingesetzt (Smith et al., 95). Milzzellen

wurden zur Überprüfung von IFN- $\gamma$  in Zellkultur-ÜS präpariert.

Die Hühner wurden mit CO<sub>2</sub> getötet, in einer Desinfektionslösung (Mucocit, 1%) gebadet und der Bauchraum und Brustbereich eröffnet. Das Blut wurde mit einer Herzpunktion (Heparin, 1000 U in Spritze vorgegeben) entnommen.

Um die PBL zu gewinnen, wurde das Blut für 10 min bei ausgeschalteter Bremse zentrifugiert (40 g). Das Serum mit der weißen Zellschicht (*buffy coat layer*) wurde entnommen. Es folgten drei Waschschrte mit RPMI-1640-Medium für 10 min (200 g). Die Zellen wurden schließlich in 3 ml RPMI-1640-Medium resuspendiert.

Die Milzzellen wurden durch Siebpassage vereinzelt und die Gewebspartikel 3 min sedimentiert. Der ÜS mit Einzelzellen wurde für 10 min pelletiert (290 g) und nach drei Waschschrten in 5 ml RPMI-1640-Medium resuspendiert.

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer und die Bestimmung der Vitalität der Zellen mit Trypan-Blau. Nur Zellfraktionen mit einer Vitalität von >95% wurden weiter verarbeitet. Die Zellzahl wurde mit RPMI-1640 auf 10<sup>7</sup> Zellen/ml eingestellt.

#### **4.10.4 IFN- $\gamma$ -Biotest mit Hilfe einer Hühnermonozytenzelllinie (HD11)**

Makrophagen/Monozyten sezernieren Stickoxid, wenn sie mit IFN- $\gamma$  stimuliert werden (Sung et al., 94). Im Biotest wird eine Hühnermonozytenzelllinie (HD11) (Beug et al., 79) genutzt, um IFN- $\gamma$  im Zellkultur-ÜS zu quantifizieren. Das durch die HD11-Zellen freigesetzte Stickoxid wandelt sich in stabiles Nitrit um, das durch eine Farbreaktion (Griess-Reaktion) nachgewiesen werden kann (Prowse and Pallister 1989).

100  $\mu$ l einer HD11-Zellsuspension (10<sup>6</sup> Zellen/ml) wurden mit 100  $\mu$ l des zu testenden Zellkultur-ÜS (von transfizierten COS-7-Zellen oder Milzzellen) versetzt und für 24 h inkubiert (40,5°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 100 % Luftfeuchtigkeit). Von diesem Zellkultur-ÜS wurden 50  $\mu$ l entnommen und mit 100  $\mu$ l Griess-Reagenz versetzt. Als Standard wurde eine 1 bis 100  $\mu$ M NaNO<sub>2</sub>-Verdünnungsreihe mitgeführt. Die Detektion des Farbumschlags erfolgte im Plattenphotometer bei 540 nm.

#### 4.10.5 Kultivierung von Zelllinien

Zur Passagierung wurden HD11-Zellen und COS-7-Zellen für 2 min mit Trypsin-EDTA-Lösung behandelt. Nach einem Waschschrift für 10 min (290 g) wurden die Zellen in frischem Medium verdünnt und weiter inkubiert (37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 100 % Luftfeuchte). HD11-Zellen wurden in Iscoves-Vollmedium und COS-7-Zellen in Dulbeccos-MEM (DMEM) kultiviert.

Um Zellen für die Langzeitlagerung einzufrieren, wurde die Zellzahl in Einfriermedium auf 5 bis 10 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml eingestellt und in Kryoröhrchen aliquotiert. Die Röhrchen wurden in einem Einfrierbehälter für mindestens 24 h bei -80°C aufbewahrt und für die Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Um gelagerte Zellen in Kultur zu nehmen, wurden diese im 37°C Wasserbad aufgetaut und in Vollmedium für 8 min gewaschen (290 g). Die Zellen konnten anschließend in Vollmedium kultiviert werden.

#### 4.10.6 Transformationstest mit PBL von Hühnern

Der Transformationstest ist eine Möglichkeit, die zelluläre Immunantwort *in vitro* zu überprüfen. Lymphozyten werden durch verschiedene Substanzen (z.B. Mitogene) stimuliert und zur Proliferation angeregt, welche mit DNA-Neusynthese einhergeht. Der Vorgang kann *in vitro* durch den Einbau von radioaktiv markierten DNA-Vorstufen (3H-Thymidin) in die neu synthetisierte DNA nachvollzogen werden. Bei kurzen Kultivierungszeiten reflektiert die Lymphozyten-Transformation die Proliferation von T-Zellen.

Je 100 µl der PBL-Suspension wurden in die Reaktionskammern einer Flachboden-Mikrotiterplatte pipettiert und die Außennäpfe mit 200 µl sterilem PBS befüllt, um Verdunstungseffekten entgegenzuwirken. Pro Ansatz wurden 100 µl rekombinantes Antigen (5 µg/ml), inaktivierte Sporozoiten (3 x 10<sup>5</sup>/Napf) oder Mitogenverdünnungen (15 µg/ml) zu den Zellen geben. Mitogenproben wurden 2 Tage und Antigenproben 4 Tage inkubiert.

Die Quantifizierung der DNA-Synthese proliferierender Lymphozyten erfolgte durch



die Ermittlung des Einbaus von radioaktiv markierten  $^3\text{H}$ -Thymidin, das 16 h vor Beendigung der Inkubationszeit zu den Zellen gegeben wurde (1  $\mu\text{Ci}$ /Reaktion). Die Zellernte erfolgte mit einem Zellernter (Wallac, Finnland) entsprechend den Angaben des Herstellers. Nach Trocknung der Filter bei  $50^\circ\text{C}$  wurde das Szintillationswachs eingeschmolzen. Die Analyse erfolgte in cpm in einem Szintillations-Spektrometer (Wallac, Finnland).

#### **4.10.7 Immunisierung von Hühnern**

Zur Immunisierung von Hühnern mit rekombinanten Antigen wurde das Adjuvans FCA eingesetzt, das eine starke humorale und zelluläre Immunreaktion (Lillehoj et al., 93) auslöst. FCA besteht aus einer Öl-Wasser-Emulsion mit inaktivierten *Mycobacterium tuberculosis*-Bakterien. Da FCA eine starke Granulombildung verursacht, wurde es lediglich für die primäre Injektion verwendet. Bei weiteren Injektionen wurden die Antigene mit FIA appliziert, welches nur aus einer Öl-Wasser-Emulsion besteht (Harlow und Lane, 88).

Zur Immunisierung wurden pro Tier 50  $\mu\text{g}$  rekombinantes Protein mit gleichem Volumen FCA oder FIA versetzt und gemischt. Die Applikation der Emulsion erfolgte subkutan in den Nacken der Tiere.

Zur DNA-Immunisierung wurde Plasmid-DNA in 0,9% NaCl (1 mg/ml) eingesetzt. Die Applikation von 100  $\mu\text{l}$  DNA-Lösung pro Tier erfolgte in den Brustmuskel der Hühner, wobei je 50  $\mu\text{l}$  auf die beiden Brustmuskeln verteilt wurden.

#### **4.10.8 Gewinnung von Seren**

Den Versuchstieren wurde jeweils vor der Immunisierung 100 bis 1000  $\mu\text{l}$  Blut aus den Flügelvenen entnommen. Das Volumen richtete sich nach der Größe der Tiere. Zur Koagulation wurde das Blut bei  $4^\circ\text{C}$  ÜN gelagert und anschließend für 20 min bei  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert (8000 g). Der Serumüberstand wurde bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

#### **4.10.9 Transfektion von eukaryotischen Zellen mit Plasmid-DNA**

Durch *in vitro*-Transfektion von eukaryotischen Zellen mit Plasmid-DNA kann die Proteinexpression heterologer Gene überprüft werden. Hierzu ist es notwendig, dass

der Vektor einen starken Promotor und eine geeignete Polyadenylierungsstelle besitzt.

#### Diethylaminoethyl (DEAE)-Dextranmethode

Einen Tag vor der Transfektion wurden konfluente COS-7-Zellen 1:5 verdünnt und in einer 25 cm<sup>2</sup>-Kulturflasche ÜN inkubiert, so dass die Zellen am nächsten Tag zu etwa 50 % konfluent waren. Kurz vor Gebrauch wurden 5 ml DMEM-Medium mit 5 µg Plasmid-DNA und 0,2 ml DEAE-Dextran-Transfektionsreagenz versetzt. Das Gemisch wurde auf die Zellen gegeben und für 4 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der ÜS durch 10 % DMSO ersetzt und der Ansatz für 2 min bei RT inkubiert. Nach einem Waschschrift mit PBS konnten die Zellen in Vollmedium weiter kultiviert werden. Um die Fluoreszenz von EGFP-Konstrukten zu überprüfen oder RT-PCR-Reaktionen durchzuführen, wurden die Zellen für 24 h bei 37°C inkubiert. Für Proteinexpressionsstudien mittels Immunblot wurden die Zellen für 48 -72 h kultiviert, danach geerntet und direkt in 100 -500 µl 2x SDS-Probenpuffer aufgenommen.

#### Transfektion mittels FuGENE®

Die Transfektion von Zellen mit FuGENE®-Reagenz (Roche, Mannheim) vermittelt eine hohe Transfektionseffizienz bei unterschiedlichen Zelltypen. Die Transfektionen wurden in 6-Napf-Zellkulturplatten durchgeführt. Dabei betrug die Konfluenz der Zellen 50 bis 80 %. Zu den Zellen wurde tropfenweise das DNA-Reagenz zugegeben und die Zellen bis zum weiteren Gebrauch bei 37°C kultiviert. Zur Herstellung des DNA-Gemischs wurden 97 µl serumfreies Medium mit 3µl FuGENE® gemischt und anschließend mit 2 µg DNA-Lösung versetzt.

## **4.11 Computeranalysen und statistische Methoden**

### **4.11.1 Sequenzanalyse nach der SignalP-Strategie**

Die SignalP-Strategie wurde angewandt, um sekretorische Proteine zu identifizieren. Diese Arbeiten wurden von R. Marhofer und P. Selzer (Intervet, Schwabenheim) durchgeführt. Zunächst wurden *E. tenella*-EST-Sequenzen mittels *sequence retrieval system* (SRS) der *European Molecular Biological Laboratories* (EMBL, <http://www.ebi.ac.uk>) auf einen Hausrechner geladen. In einem ersten Schritt wurden

die Sequenzen mit der Computersoftware *Lasergene-Seqman* (DNASTAR Inc., USA) zu sogenannten Contigs zusammengefasst (Selzer et al., 04). Die Contig-Sequenzen sind unter folgender Internetadresse zu finden: [http://www.biologie.hu-berlin.de/~molpara/kokzidien\\_en](http://www.biologie.hu-berlin.de/~molpara/kokzidien_en). Diese Contigs wurden anschließend mit den beiden Proteindatenbanken Swissprot und TrEMBL (Boeckmann et al., 03) mittels blastx (Gish und States, 93) verglichen. Das blastx-Computerprogramm erlaubt es Nukleinsäuresequenzen mit Proteinsequenzen zu vergleichen. Die Proteine mit den größten Übereinstimmungen wurden anschließend für eine Signalsequenzanalyse nach Nielsen et al. (1997) genutzt. Hierfür wurden nur Proteine mit einem *E-value* größer  $10^{-4}$  berücksichtigt.

Aufgrund der großen Datenmengen wurden die dargestellten Arbeitsschritte mit Hilfe der Analysesoftware "*LION bioSCOUT DO\_ALL*" (LION bioscience AG, Heidelberg) durchgeführt.

#### **4.11.2 Sequenz- und Datenbankanalysen**

Die bioinformatische Analyse von Nukleinsäure- und Proteinsequenzen erfolgte mit dem Programmpaket MacVektor (Pharmacopeia, USA) nach Anleitungen des Herstellers. Die Arbeiten umfassten hauptsächlich die Ermittlung von passenden Primerbindungsstellen, Identifizierung von ORF aus Nukleinsäuresequenzen, Übersetzung von Nukleinsäuresequenzen in Proteinsequenzen, Vergleich von Sequenzen und Datenbanken.

Die Sequenzvergleiche in den verschiedenen Datenbanken wurden mittels verschiedener blast-Programme durchgeführt (Altschul et al., 97; Gish und States, 93).

#### **4.11.3 Statistische Methoden**

Die statistische Auswertung der Versuche erfolgte mit dem U-Test für den Vergleich zweier unabhängige Stichproben (Sachs, 92), wobei Unterschiede zwischen den Gruppen mit  $p < 0,05$  als signifikant angesehen wurden.

Von mehrfach bestimmten Meßwerten wurde der arithmetische Mittelwert gebildet und die Standardabweichung errechnet.

## 5 Material

### 5.1 Laborgeräte

Autoklav	Varioklav, Oberschleißheim
Blot-Apparatur (Semidry-Blot)	LMS, Dossenheim
CO <sub>2</sub> -Inkubationsschrank	Heraeus Christ, Zürich
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Oberkochen
Gelelektrophorese-Apparatur	AGS, Heidelberg
Minigelapparatur, Midget	Pharmacia Biotech, Freiburg
PCR-Gerät, PTC-200	MJ Research; Waltham
Plattenphotometer, MRX	Dynatech, Denkendorf
Sequenzier-Apparatur	Pharmacia, Freiburg
Spektralphotometer	Eppendorf, Hamburg
Szintillationsspektrometer, 1450 MicroBetaTrilux	Wallac, Finnland
Umkehrmikroskop, Labovert	Leica, Wetzlar
Videodokumentationsgerät	Herolab, Wiesloch
Zellernter	Wallac, Finnland

### 5.2 Verbrauchsmaterialien

Dialysemembranen	Serva, Heidelberg
Einmal-Sterilfilter (0,2 µm), Gel-Blotting-Papier	Schleicher & Schüll, Dassel
ELISA-Platten, MaxiSorp	Nunc, Wiesbaden
Glasperlen (0,5 mm)	Braun Biotech, Melsungen
Nitrocellulosemembran (0,2 µm)	Pharmacia Biotech, Freiburg
Zellkultur- und Mikrotiterplatten	Costar, Bodenheim
Glasfaserfilter, Filtermat A; Szintillationswachs	Wallac, Finnland
MultiLex A	
Dynabeads® Oligo (dT) <sub>25</sub>	Dynal, Norwegen
Ni-NTA-Matrix	Qiagen, Hilden

### 5.3 Chemikalien, Sonstiges

Ampicillin, Tetracyclin, Kanamycin, BSA (Fraktion V)	AppliChem, Darmstadt
Bacto-Agar, -Trypton, Hefeextrakt, Taurodexycholeat	DIFCO, Hamburg
Magermilchpulver	Fluka, Deisenhofen
Dulbeccos MEM, L-Glutamin, Hank's Medium, Penicillin/Streptomycin, RPMI-1640 mit HEPES, FCS,	GIBCO/BRL, Karlsruhe

Glycerin, Trypsin/EDTA (0,25/0,02%),	
Na-Heparin, Liquemin	Hofman La Roche, Grenzach
3H-Thymidin	ICN, Eschwege
Organische Lösungsmittel, DMF, DMSO, Glaswolle	Merck, Darmstadt
ConA, Ficoll-Hypaque, Proteingewichtsmarker	Pharmacia Biotech, Freiburg
Acrylamid-Bisacrylamid-Lsg. (30 %), Ammonium- peroxidisulfat (APS), Agarose, Dextrose, Glaswolle, Natriumhypochlorid, Nylonwolle, Puffersalze (p.A.), Raffinose, TEMED, Triton X-100, Tween-20,	Roth, Karlsruhe
Antimycin A, BCIP, Coomassie-Blau R 250, DE-52 Zellulose, Dithiothreitol (DTT), FCA, FIA, Iscove's MDM, IPTG, LPS, Naphthylethylen, NBT, PNPP, Ponceau S, Sulfanilamid, TRIS, Trypan-Blau, Tryptophan <i>dropout</i> -Pulver, YNB	Sigma, München

## 5.4 Kommerzielle Kits und Enzyme

BCA-Proteinbestimmungs-Kit	Pierce, USA
Dynabeads-mRNA-DIRECT-Kit	Dynal, Norwegen
Geltrockner-Kit, pGEM-T-Vektorsystem, RT (M-MLV), Taq-Polymerase, DNase	Promega, Heidelberg
Nucleobond-Maxi-Kit, Nucleospin-Plasmid-Kit, NucleoTrap-Gel-Extraktion-Kit	BD Clontech, Heidelberg
PegGOLD-RNAPure	pegLab, Erlangen
Sequenase-Sequenzier-Kit	Amersham, USA
SuperScript-cDNA-Synthesis-Kit ( <i>E. coli</i> DNA Ligase, <i>E. coli</i> DNA Polymerase I, <i>E. coli</i> RNase H, RT- Superscript II, T4- Polynukleotidkinase, T4 DNA- Polymerase)	Life Technologies
Lysozym	Roth, Karlsruhe
Restriktionsenzyme, T4-DNA-Ligase	NEB, Frankfurt
FuGENE	Roche, Mannheim

## 5.5 Antikörperkonjugate, Immunchemikalien

Kaninchen-anti-Ziege-IgG-AP(ELISA, 1:1500)	Dianova, Hamburg
Kaninchen-anti- <i>E. tenella</i> (OAg)-Serum (Blot, 1:200)	Charles River, Kisslegg
Maus-anti-EGFP-Serum (Blot, 1:200)	G. Meusel, im Haus
Maus-anti-myc-Ak (Blot, 1:5000)	Invitrogen, Karlsruhe
Maus-anti-Poly 6xHis-Ak (Blot, 1:1000)	Quiagen, Hilden
Ziege-anti-Huhn-IgA-Fc (ELISA, 1:1000)	Bethyl, USA
Ziege-anti-Huhn-IgG-Fc (ELISA, 1:1000)	Bethyl, USA
Ziege-anti-Kaninchen-IgG-AP(Blot, 1:1500)	Dianova, Hamburg

## 5.6 Tiermaterial und permanente Zelllinien

"Weiße Leghorn" Hühner	Versuchsstation Tierzucht, Blumberg
<i>Eimeria tenella</i> (Houghton-Stamm)	Frau Dr. Giesela Greif, Abteilung Parasitologie, Bayer AG, Monheim
Hühnermonozytenzelllinie (HD11)	Dr. Phi Van, BFA für Landwirtschaft, Zelle
Affennierenzelllinie (COS-7)	S. Hartmann, im Haus

## 5.7 Bakterienstämme, Hefestämme und Plasmide

<i>Escherichia coli</i> XL1- Blue	Stratagene, Heidelberg
pCDNA3	Invitrogen, Karlsruhe
pGEM-T	Promega, USA
pQE30	Qiagen, Hilden
pQE30-Etmic1,-SO7,-TA4	Dr. T. Pogonka, im Haus
pSUC2T7M13ORI (pSUC2)	Genetics Institute, USA
pVR1012	Vical, USA
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> YTK12 ( <i>suc2<sup>-</sup></i> , <i>trp<sup>-</sup></i> )	Genetics Institute, USA
pCDNA3-chIL-18	K. Schneider, Institut für Medizin, Universität Freiburg

## 5.8 Oligonukleotide, Adaptoren

H01_F2 (HindIII)	CAAGCTTATGTCACCTGAGCCCCCTCCT
H01_R1 (XhoI)	TCGCTCGAGTCAGTCTTCGCGCTCGG
H03_F2 (HindIII)	GCAAGCTTATGGTTAAGTTGGGCAGCTCT
H03_R1 (XhoI)	CGCTCGAGCTAGTCCGCCTGGGCCTCG
H04_F2 (HindIII)	CAAGCTTGATGGATGTTGGCGTTTACTCTC
H04_R1 (XhoI)	CGCTCGAGTTAATTTCTCTTCGAGGC
H07_F2 (HindIII)	CAAGCTTGATGCAGGAAGAAGAAGGGTCC
H07_R1 (XhoI)	CGCTCGAGTCATACTGCAGCCATCCCAAG
H09_F2 (BamHI)	CGGGATCCATGGCTGCAGTCCGGGAAGG
H09_R1 (XhoI)	CCCTCGAGTCACCGGAGAGCAATGAAG
H11_F2 (BamHI)	CGGGATCCCATGAACTCACAAGAACTGA
H11_R1 (XhoI)	CCTCGAGTCATAGAGTCATAATGCCGAACG
H13_F2 (BamHI)	CGGGATCCCATGGAGCGTTCAACAATC
H13_R1 (XhoI)	CGCTCGAGTCAAGATCGACTTTGTTGTC
H14_F2 (HindIII)	CCAAGCTTATGTTAACTGCCTTTTATCT
H14_R1 (XhoI)	CGCTCGAGTTATTGCTTTACAGTGATA

H15_F2 (HindIII)	CCAAGCTTATGAACTGTGGAACGCAAGGA
H15_R1 (NotI)	CGCGGCCCGCCTACCTCTGTAACGCAACG
H24_F2 (HindIII)	CAAAGCTTATGCTCACCGGCACAGCGACA
H24_R1 (XhoI)	CGCTCGAGTCAATCCCTCAAATCGATG
H28_F2 (HindIII)	CCAAGCTTATGGGGCAGACCATTGATGTC
H28_R1 (XhoI)	GGCTCGAGCTACAGACTCCAAAGTACAG
H35_F2 (HindIII)	CCAAGCTTATGTCAGATGATGGCAGCAAC
H35_R1 (XhoI)	CGCTCGAGCTACTGCTCGCCGTTGCCAGC
H36_F2 (HindIII)	CCAAGCTTATGCTGTCAAGGAAGGCCTTA
H36_R1 (XhoI)	CGCTCGAGTCACGAATAGATCAGGACGC
Zufallsprimer (XhoI)	CGATTGAATTCTAGACCTGCCTCGAGNNNNNNNN
EcoRI-Adaptor	AATTCGCGGCCGCGTCGAC pGTCGACGCGGCCGCG
Sequenzierprimer für cDNA in pSUC2	Cy5-CCTCGTCATTGTTCTCGTTCCCTT
cDNA-F (für pSUC2)	CCTCGTCATTGTTCTCGTTCCCTT
cDNA-R (für pSUC2)	GGTGTGAAGTGGACCAAAGGTCTA
myc-Oligo1	AGCTATGGAGCAAAAGCTCATTTCTGAAGAGGACTTGAA GCTTGGTAC
myc-Oligo2	CAAGCTTCAAGTCCTCTTCAGAAATGAGCTTTTGCTCCAT
EtMIC-F10 (BamHI)	GCGGATCCATGAGCCTCTTGATGTCAT
EtMIC-R10 (XbaI)	CCTCTAGATTAGGATGCCACATCTCTGA
EtMIC-F11 (HindIII)	CGCAAGCTTATGAGCCTCTTGATGTCAT
EtMIC-R11 (BamHI)	GTGGATCCCTGGATGCCACATCTCTGA
SO7-F10 (BamHI)	GCGGATCCATGGCTGTTGCTGCAGCAGATTT
SO7-R10 (XbaI)	CCTCTAGACTACCAGAAGAAGCCGGAGGG
SO7-F11 (HindIII)	CGCAAGCTTATGGCTGTTGCTGCAGCAGATTT
SO7-R11 (BamHI)	CTGGATCCTGCCAGAAGAAGCCGGAGGG
TA4-F10 (BamHI)	GCGGATCCATGCAGGATTACCCAACAG
TA4-R10 (XbaI)	GATCTAGACTAAAAGAGCGAAAGCGGAGA
TA4-F11 (HindIII)	CGCAAGCTTATGCAGGATTACCCAACAGT
TA4-R11 (BamHI)	GTGGATCCCTAAAGAGCGAAAGCGGAGA
IFN- $\gamma$ -F3 (EcoRI)	CGGAATTCATGACTTGCCAGACTTAC
IFN- $\gamma$ -F4 (Sall)	CGGTCGACATGACTTGCCAGACTTAC
IFN- $\gamma$ -R3 (XbaI)	CGTCTAGATTAGCAATTGCATCTCT

## 5.9 Puffer, Medien und Stammlösungen

### Allgemein

Griess-Reagenz	0,1 % (w/v) Naphthylethylen 1,0 % (w/v) Sulfanilamid in 2,5 % Phosphorsäure ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ )
$\text{H}_2\text{O}$	deionisiertes Wasser (Millipore) mit einer Leitfähigkeit kleiner 15 mSi
PBS	136,9 mM NaCl 2,7 mM KCl 8,1 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 1,5 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ pH 7,4
TE-Puffer	1 mM EDTA 10 mM Tris-HCl, pH 7,4-8,0

### Bakterienlösungen

LB-Medium	10 g/l Bacto-Trypton 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l NaCl pH 7,0
SOB-Medium	20 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 0,5 g/l NaCl 2,5 ml/l 1 M KCl 0,2 ml/l 5 N NaOH
SOC-Medium	SOB + 20 mM Glukose
Agar-Platten	LB-Medium mit 1,5% Bacto-Agar
10x Hogness-Einfriermedium	36 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 13 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 20 mM Na-Citrat 10 mM $\text{MgSO}_4$ 40% Glyzerin
Na-Ampicillin	50 mg/ml
Tetracyclin-HCl	10 mg/ml in Ethanol
Kanamycin	25 mg/ml

### Hefemedien

YPD-Medium	10 g/l Hefeextrakt 20 g/l Pepton 20 g/l Dextrose
------------	--



YPRAA-Medium	10 g/l Hefeextrakt 20 g/l Pepton 20 g/l Raffinose 1 ml/l AntimycinA (50 mg/ml)
CMD-W-Medium	1,7 g/l YNB 5 g/l Ammoniumsulfat 20 g/l Dextrose 1,9 g/l Tryptophan <i>dropout</i> -Pulver
Agarplatten	Medium mit 2 % Bacto-Agar
2 x Einfriermedium	Medium mit 30 % Glycerin
Saccharoselösung, gepuffert (Invertasetest)	5 % Saccharoselösung 10 mM Acetatpuffer, pH 4,7
Entwicklungslösung (Invertasetest)	0,1 % 2,3,5,-Triphenylterazoliumchlorid (TTC) in 1 N NaOH

#### Zellkulturmedien für eukaryotische Zellen

RPMI 1640-Vollmedium (für PBL und Milzzellen)	457,5 ml RPMI 1640 12,5 ml L-Glutamin (2,5%) 5 ml Penicillin/Streptomycin(100 U/ml und 100 µg/ml) 25 ml FCS (5%) (Hitze-inaktiviert)
Trypan-Blau-Lösung	160 mg Trypan-Blau in 100 ml PBS
Iscove's Vollmedium (für HD11-Zellen)	425 ml Iscove's MDM 50 ml FCS (Hitze-inaktiviert) 20 ml L-Glutamin 5 ml Penicillin/Streptomycin(100 U/ml und 100 µg/ml)
Dulbeccos-Vollmedium (für COS-7-Zellen)	425 ml Dulbeccos-MDM 50 ml FCS (Hitze-inaktiviert) 20 ml L-Glutamin 5 ml Penicillin/Streptomycin(100 U/ml und 100 µg/ml)
Einfriermedium	9 Teile Vollmedium 1 Teil DMSO
DEAE-Dextran-Transfektionsreagenz	10 mg/ml DEAE-Dextran, in PBS 2,5 mg/ml Chloroquine, in PBS

#### Aufreinigung von *E. tenella*-Sporozoiten

Exzystierungsmedium	5 g Taurodeoxycholat 10 ml Trypsinlösung (Aktivität 1:250) in 125 ml Hank's-Medium
2 x Phosphatpuffer	190 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 13 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,85 % NaCl pH 8,0

Phosphatpuffer/Glukose	1 x Phosphatpuffer 1 % Glukose
------------------------	-----------------------------------

#### Aufreinigung von pQE-30-Expressionsprodukten

Puffer A	6 M Guanidiumhydrochlorid 120 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM Tris-HCl, pH 8,0
Puffer B	8 M Harnstoff 100 mM Na H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM Tris-HCl, pH 8,0
Puffer C	wie Puffer B, pH 6,3
Puffer E	wie Puffer B, pH 4,0

#### Herstellung kompetenter Bakterien und Hefen

Transformationspuffer (für <i>E. coli</i> )	10 mM Pipes 55 mM MnCl <sub>2</sub> 15 mM CaCl <sub>2</sub> 250 mM KCl
Lithiumacetatlösung (für Hefe)	1 Vol 10 x TE-Puffer, pH 7,5 1 Vol 10 x Lithiumacetat (1 M, pH 7,5) 8 Vol MilliQ-H <sub>2</sub> O
PEG-Lösung (für Hefe)	1 Vol 10 x TE-Puffer, pH 7,5 1 Vol 10 x Lithiumacetat (1 M, pH 7,5) 8 Vol 50 % (w/v) PEG 4000

#### Plasmidisolation aus Bakterien und Hefen

Lysepuffer I (für Hefe)	1% Triton X-100 2 mM EDTA 20 mM Tris-HCl, pH 8,9
Lysepuffer II (für Hefe)	100 mM NaCl 1 mM EDTA 0,1 % SDS 10 mM Tris-HCl, pH 8,0
STET-Puffer (für <i>E. coli</i> )	8 % Sacharose 0,1 % Triton X-100 50 mM EDTA 50 mM Tris-HCl, pH 8,0
CTAB-Lösung (für <i>E. coli</i> )	10 % in H <sub>2</sub> O

#### Agarosegelelektrophorese

10 x TBE	900 mM Tris-HCl 900 mM Borsäure 20 mM EDTA, pH 8,0
----------	--

10 x Ladepuffer	25 % Ficoll
	0,1 % Bromphenolblau
	0,1 % Xylencyanol FF

### SDS-PAGE

Acrylamidlösung (30%)	30% Acrylamid (w/v)
	0,8% Bisacrylamid (w/v)
Sammelgelpuffer	1,0 M Tris-HCl, pH 6,8
Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl, pH 8.8
2 x Probenpuffer	125 mM Tris-HCl, pH 6,8
	4% SDS
	20% Glyzerin
	0,1% BPB
	100 mM DDT
Elektrophoresepuffer	250 mM Glycine
	25 mM Tris-HCl, pH 8,3
	0,1% SDS
Färbelösung	0,1% Coomassie-Blau R-250
	20 % Methanol
	10 % Essigsäure
Entfärbelösung	30% Ethanol
	10% Essigsäure

Gebrauchslösung	Trenngel 15% (10 ml)	Sammelgel 5 % (2ml)
H <sub>2</sub> O	2,3 ml	1,4 ml
Acrylamidlösung	5,0 ml	0,33 ml
Sammelgelpuffer	-	0,25 ml
Trenngelpuffer	1,3 ml	-
10 % SDS	0,1 ml	20 µl
10 % APS	0,1 ml	20 µl
TEMED	4 µl	2 µl

### Immunblot

Blockierungspuffer	5 % Magermilchpulver in PBS
Transferpuffer	48 mM Tris-HCl
	39 mM Glycin
	0,037% SDS
	20% Methanol
Ponceau-Stammlösung	2% PonceauS
	30% Trichloressigsäure
	30% Sulfobenzoessäure
Waschpuffer	0,2 % Triton X-100 in PBS
AP-Puffer	100 mM Tris-HCl, pH 9,5
	100 mM NaCl
	5 mM MgCl <sub>2</sub>

NBT-Stammlösung	75 mg/ml in 70% DMF
BCIP-Stammlösung	50 mg/ml in 100% DMF
AP-Substratlösung	66 µl NBT-Stamm-Lösung 33 µl BCIP-Stamm-Lösung 10 ml AP-Puffer

### ELISA

Beschichtungspuffer (Puffer I)	0,2 M Na-Carbonat, pH 9,4-9,7 (aus 0,2 M NaHCO <sub>3</sub> und 0,2 M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ) 0,02 % NaN <sub>3</sub>
ELISA-Puffer II	0,1 % Tween 20 3 % BSA in PBS, pH 7,2
ELISA-Puffer III	Puffer I 1 mM MgCl <sub>2</sub>
Waschpuffer	0,9 % NaCl 0,1 % Tween 20
PNPP-Substratlösung	unmittelbar vor Messung 1 x Substrattablette Sigma 104-105 in 5 ml ELISA-Puffer III lösen.

### Kopplung von Peptiden an BSA

BSA	0,8 mg/ml
myc-Peptid	0,4 mg/ml
Glutaraldehyd	0,08 % in 0,1 M NaHCO <sub>3</sub>

### Sequenzierung

Polyacrylamid-Gel	9 ml Acrylamidlösung (40 %) 25,2 g Harnstoff 3,6 ml 10 x TBE 27 ml MilliQ-H <sub>2</sub> O 60 µl TEMED 250 µl APS (10%)
-------------------	--

### Puffer zur enzymatischen Modifizierung von DNA

10 x PCR-Puffer	500 mM KCl 100 mM Tris-HCl, pH 9,0 15 mM MgCl <sub>2</sub> 1 % Triton X-100
5 x RT-Puffer (für M-MLV)	250 mM Tris-HCl.pH 8,3 375 mM KCl 15 mM MgCl <sub>2</sub> 50 mM DTT

10 x Ligasepuffer	500 mM Tris-HCl, pH 7,5 100 mM MgCl <sub>2</sub> 100 mM DTT 10 mM ATP 150 µg/ml BSA
10 x DNase-Puffer	400 mM Tris-HCl, pH 8,0 100 mM MgSO <sub>4</sub> 10 mM CaCl <sub>2</sub>
5 x T4 Polynukleotidkinase-Puffer	300 mM Tris-HCl, pH 7,6 50 mM MgCl <sub>2</sub> 5 mM ATP
5 x Zweitstrang-Puffer	100 mM Tris, pH 6,9 450 mM KCl 23 mM MgCl <sub>2</sub> 0,75 mM NAD <sup>+</sup> 50 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>

#### Datenbanken und Web-Services

<i>E. tenella</i> -EST-Datenbank (Tigr)	<a href="http://www.tigr.org/tigrscripts/tgi/T_index.cgi?species=e_tenella">http://www.tigr.org/tigrscripts/tgi/T_index.cgi?species=e_tenella</a>
<i>Apikpmplexa</i> -EST-Datenbank	<a href="http://www.cbil.upenn.edu/apidots/">http://www.cbil.upenn.edu/apidots/</a>
<i>E. tenella</i> -Genom und EST-Datenbank (Sanger)	<a href="http://www.sanger.ac.uk/Projects/E_tenella/">http://www.sanger.ac.uk/Projects/E_tenella/</a>
blast-Service	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/</a>
diverse Sequenzanalysen	<a href="http://www.ebi.ac.uk/services/">http://www.ebi.ac.uk/services/</a>
blast-Surver für Parasiten-EST	<a href="http://www.ebi.ac.uk/blast2/parasites.html">http://www.ebi.ac.uk/blast2/parasites.html</a>
SignalP (Nielsen et al. 1997)	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/">http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/</a>

## 6 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADH	Alkoholdehydrogenase
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxidisulfat
APZ	Antigenpräsentierende Zellen
BCA	2,2' Bicinchoninic acid
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
cfu	<i>colony forming units</i>
CMD-W	<i>complete minimal dextrose medium without tryptophane</i>
CMV	Cytomegalivirus
ConA	Concanavalin A
cpm	<i>counts per minute</i>
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DZ	Dendritische Zellen
DEAE	Diethylaminoethyl
DMEM	<i>Dulbeccos minimal essential medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-desoxy-Nukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	<i>Ethylenediamino-tetraacetic acid</i>
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EST	<i>expressed sequence tags</i>
FCA	<i>Freund's complete adjuvans</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FIA	<i>Freund's incomplete adjuvans</i>
g	Zentrifugalbeschleunigung
GALT	<i>gut associated lymphoid tissue</i>
IEL	Intraepitheliale Lymphozyten
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
INF	Interferon

IPTG	Isopropyl-thio- $\beta$ -D-Galaktopyranosid
kb	Kilo-Basen
LB	<i>Luria-Bertoni-broth medium</i>
MCS	<i>multi cloning site</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
NC	Nitrocellulose
NK	Natürliche Killerzellen
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i>
PAGE	Polyacrylamid-Glektrophorese
PBL	periphere Blutlymphozyten
PBS	Phosphate bufferd saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PNPP	para-Nitrophenylphosphat
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNase	Ribonuklease
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
SDS	<i>sodium dodecylsulfate</i>
SI	Stimulationsindex
SRS	<i>sequence retrieval system</i>
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TH	T-Helfer-Zelle
TMB	3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidin
TTC	2,3,5,-Triphenylterazoliumchlorid
U	<i>unit</i>
ÜN	über Nacht
ÜS	Überstand
Vol	Volumen
X-gal	5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl- $\beta$ -Galaktosid
YPD	<i>yeast peptone dextrose medium</i>
YPRAA	<i>yeast peptone raffinose medium with antimycin A</i>

## 7 Literatur

- Allen, P. C. und Fetterer, R. H. (2002): Recent advances in biology and immunobiology of *Eimeria* species and in diagnosis and control of infection with these coccidian parasites of poultry, Clin.Microbiol.Rev. (volume 15), issue 1, pp. 58-65. URL: PM:11781266
- Altschul, S. F.; Madden, T. L.; Schaffer, A. A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W. und Lipman, D. J. (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, Nucleic Acids Res. (volume 25), issue 17, pp. 3389-3402. URL: PM:9254694
- Anders, R. F.; Crewther, P. E.; Edwards, S.; Margetts, M.; Matthew, M. L.; Pollock, B. und Pye, D. (1998): Immunisation with recombinant AMA-1 protects mice against infection with *Plasmodium chabaudi*, Vaccine (volume 16), issue 2-3, pp. 240-247. URL: PM:9607037
- Angus, C. W.; Klivington-Evans, D.; Dubey, J. P. und Kovacs, J. A. (2000): Immunization with a DNA plasmid encoding the SAG1 (P30) protein of *Toxoplasma gondii* is immunogenic and protective in rodents, J.Infect.Dis. (volume 181), issue 1, pp. 317-324. URL: PM:10608781
- Ausubel, F. M.; Brent, R.; Kingston, R. E.; Moore, D. D.; Seidman, J. G.; Smith, J. A. und Struhl, K. J. (1995): Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley, New York.
- Barry, M. A. und Johnston, S. A. (1997): Biological features of genetic immunization, Vaccine (volume 15), issue 8, pp. 788-791. URL: PM:9234514
- Barry, M. A.; Lai, W. C. und Johnston, S. A. (1995): Protection against mycoplasma infection using expression-library immunization, Nature (volume 377), issue 6550, pp. 632-635. URL: PM:7566175
- Barta, O.; Barta, V. und Pierson, F. W. (1992): Optimum conditions for the chicken lymphocyte transformation test, Avian Dis. (volume 36), issue 4, pp. 945-955. URL: PM:1485878
- Bendtsen, J. D.; Nielsen, H.; von Heijne, G. und Brunak, S. (2004): Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0, J.Mol.Biol. (volume 340), issue 4, pp. 783-795. URL: PM:15223320
- Beug, H.; von Kirchbach, A.; Doderlein, G.; Conscience, J. F. und Graf, T. (1979): Chicken hematopoietic cells transformed by seven strains of defective avian leukemia viruses display three distinct phenotypes of differentiation, Cell (volume 18), issue 2, pp. 375-390. URL: PM:227607
- Bhogal, B. S.; Miller, G. A.; Anderson, A. C.; Jessee, E. J.; Strausberg, S.; McCandliss, R.; Nagle, J. und Strausberg, R. L. (1992): Potential of a recombinant antigen as a prophylactic vaccine for day-old broiler chickens against *Eimeria acervulina* and *Eimeria tenella* infections, Vet.Immunol.Immunopathol. (volume 31), issue 3-4, pp. 323-335. URL: PM:1589958
- Binger, M. H.; Hug, D.; Weber, G.; Schildknecht, E.; Humbelin, M. und Pasamontes, L. (1993): Cloning and characterization of a surface antigen of *Eimeria tenella* merozoites and expression using a recombinant vaccinia virus, Mol.Biochem.Parasitol. (volume 61), issue 2, pp. 179-187. URL: PM:8264722
- Birnboim, H. C. und Doly, J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA, Nucleic Acids Res. (volume 7), issue 6, pp. 1513-1523. URL: PM:388356
- Bloom, T. J. und Beavo, J. A. (1996): Identification and tissue-specific expression of PDE7 phosphodiesterase splice variants, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A (volume 93),



issue 24, pp. 14188-14192. URL: PM:8943082

Boeckmann, B.; Bairoch, A.; Apweiler, R.; Blatter, M. C.; Estreicher, A.; Gasteiger, E.; Martin, M. J.; Michoud, K.; O'Donovan, C.; Phan, I.; Pilbout, S. und Schneider, M. (2003): The SWISS-PROT protein knowledgebase and its supplement TrEMBL in 2003, *Nucleic Acids Res.* (volume 31), issue 1, pp. 365-370. URL: PM:12520024

Bojang, K. A.; Milligan, P. J.; Pinder, M.; Vigneron, L.; Alloueche, A.; Kester, K. E.; Ballou, W. R.; Conway, D. J.; Reece, W. H.; Gothard, P.; Yamuah, L.; Delchambre, M.; Voss, G.; Greenwood, B. M.; Hill, A.; McAdam, K. P.; Tornieporth, N.; Cohen, J. D. und Doherty, T. (2001): Efficacy of RTS,S/AS02 malaria vaccine against *Plasmodium falciparum* infection in semi-immune adult men in The Gambia: a randomised trial, *Lancet* (volume 358), issue 9297, pp. 1927-1934. URL: PM:11747915

Boyle, C. M.; Morin, M.; Webster, R. G. und Robinson, H. L. (1996): Role of different lymphoid tissues in the initiation and maintenance of DNA-raised antibody responses to the influenza virus H1 glycoprotein, *J.Virol.* (volume 70), issue 12, pp. 9074-9078. URL: PM:8971047

Bozdech, Z.; Zhu, J.; Joachimiak, M. P.; Cohen, F. E.; Pulliam, B. und DeRisi, J. L. (2003): Expression profiling of the schizont and trophozoite stages of *Plasmodium falciparum* with a long-oligonucleotide microarray, *Genome Biol.* (volume 4), issue 2, pp. R9. URL: PM:12620119

Breed, D. G.; Dorrestein, J. und Vermeulen, A. N. (1996): Immunity to *Eimeria tenella* in chickens: phenotypical and functional changes in peripheral blood T-cell subsets, *Avian Dis.* (volume 40), issue 1, pp. 37-48. URL: PM:8713046

Breed, D. G.; Schetters, T. P.; Verhoeven, N. A. und Vermeulen, A. N. (1997): Characterization of phenotype related responsiveness of peripheral blood lymphocytes from *Eimeria tenella* infected chickens, *Parasite Immunol.* (volume 19), issue 12, pp. 563-569. URL: PM:9458468

Brothers, V. M.; Kuhn, I.; Paul, L. S.; Gabe, J. D.; Andrews, W. H.; Sias, S. R.; McCaman, M. T.; Dragon, E. A. und Files, J. G. (1988): Characterization of a surface antigen of *Eimeria tenella* sporozoites and synthesis from a cloned cDNA in *Escherichia coli*, *Mol.Biochem.Parasitol.* (volume 28), issue 3, pp. 235-247. URL: PM:3290678

Brown, P. J.; Billington, K. J.; Bumstead, J. M.; Clark, J. D. und Tomley, F. M. (2000): A microneme protein from *Eimeria tenella* with homology to the Apple domains of coagulation factor XI and plasma pre-kallikrein, *Mol.Biochem.Parasitol.* (volume 107), issue 1, pp. 91-102. URL: PM:10717305

Campos-Neto, A.; Webb, J. R.; Greeson, K.; Coler, R. N.; Skeiky, Y. A. und Reed, S. G. (2002): Vaccination with plasmid DNA encoding TSA/LmSTI1 leishmanial fusion proteins confers protection against *Leishmania major* infection in susceptible BALB/c mice, *Infect.Immun.* (volume 70), issue 6, pp. 2828-2836. URL: PM:12010969

Chai, J. Y. und Lillehoj, H. S. (1988): Isolation and functional characterization of chicken intestinal intra-epithelial lymphocytes showing natural killer cell activity against tumour target cells, *Immunology* (volume 63), issue 1, pp. 111-117. URL: PM:3338816

Chang, H. C.; Lin, T. L. und Wu, C. C. (2001): DNA-mediated vaccination against infectious bursal disease in chickens, *Vaccine* (volume 20), issue 3-4, pp. 328-335. URL: PM:11672894

Chapman, H. D. (1998): Evaluation of the efficacy of anticoccidial drugs against *Eimeria* species in the fowl, *Int.J.Parasitol.* (volume 28), issue 7, pp. 1141-1144. URL: PM:9724885

Chapman, H. D.; Cherry, T. E.; Danforth, H. D.; Richards, G.; Shirley, M. W. und

- Williams, R. B. (2002): Sustainable coccidiosis control in poultry production: the role of live vaccines, *Int.J.Parasitol.* (volume 32), issue 5, pp. 617-629. URL: PM:11943233
- Chapman, H. D. und Hacker, A. B. (1994): Sensitivity of field isolates of *Eimeria* from two broiler complexes to anticoccidial drugs in the chicken, *Poult.Sci.* (volume 73), issue 9, pp. 1404-1408. URL: PM:7800639
- Chen, H. und Leder, P. (1999): A new signal sequence trap using alkaline phosphatase as a reporter, *Nucleic Acids Res.* (volume 27), issue 4, pp. 1219-1222. URL: PM:9927759
- Chiang, C. W.; Carter, N.; Sullivan, W. J., Jr.; Donald, R. G.; Roos, D. S.; Naguib, F. N.; el Kouni, M. H.; Ullman, B. und Wilson, C. M. (1999): The adenosine transporter of *Toxoplasma gondii*. Identification by insertional mutagenesis, cloning, and recombinant expression, *J.Biol.Chem.* (volume 274), issue 49, pp. 35255-35261. URL: PM:10575012
- Choi, K. D.; Lillehoj, H. S. und Zalenga, D. S. (1999): Changes in local IFN-gamma and TGF-beta4 mRNA expression and intraepithelial lymphocytes following *Eimeria acervulina* infection, *Vet.Immunol.Immunopathol.* (volume 71), issue 3-4, pp. 263-275. URL: PM:10587306
- Cleary, M. D.; Singh, U.; Blader, I. J.; Brewer, J. L. und Boothroyd, J. C. (2002): *Toxoplasma gondii* asexual development: identification of developmentally regulated genes and distinct patterns of gene expression, *Eukaryot.Cell* (volume 1), issue 3, pp. 329-340. URL: PM:12455982
- Coler, R. N.; Skeiky, Y. A.; Bernards, K.; Greeson, K.; Carter, D.; Cornellison, C. D.; Modabber, F.; Campos-Neto, A. und Reed, S. G. (2002): Immunization with a polyprotein vaccine consisting of the T-Cell antigens thiol-specific antioxidant, *Leishmania major* stress-inducible protein 1, and *Leishmania* elongation initiation factor protects against leishmaniasis, *Infect.Immun.* (volume 70), issue 8, pp. 4215-4225. URL: PM:12117930
- Crane, M. S.; Goggin, B.; Pellegrino, R. M.; Ravino, O. J.; Lange, C.; Karkhanis, Y. D.; Kirk, K. E. und Chakraborty, P. R. (1991): Cross-protection against four species of chicken coccidia with a single recombinant antigen, *Infect.Immun.* (volume 59), issue 4, pp. 1271-1277. URL: PM:2004809
- Crane, M. S.; Murray, P. K.; Gnozzio, M. J. und MacDonald, T. T. (1988): Passive protection of chickens against *Eimeria tenella* infection by monoclonal antibody, *Infect.Immun.* (volume 56), issue 4, pp. 972-976. URL: PM:3346078
- Crewther, P. E.; Matthew, M. L.; Flegg, R. H. und Anders, R. F. (1996): Protective immune responses to apical membrane antigen 1 of *Plasmodium chabaudi* involve recognition of strain-specific epitopes, *Infect.Immun.* (volume 64), issue 8, pp. 3310-3317. URL: PM:8757869
- Cubitt, A. B.; Heim, R.; Adams, S. R.; Boyd, A. E.; Gross, L. A. und Tsien, R. Y. (1995): Understanding, improving and using green fluorescent proteins, *Trends Biochem.Sci.* (volume 20), issue 11, pp. 448-455. URL: PM:8578587
- Danforth, H. D.; Augustine, P. C.; Ruff, M. D.; McCandliss, R.; Strausberg, R. L. und Likel, M. (1989): Genetically engineered antigen confers partial protection against avian coccidial parasites, *Poult.Sci.* (volume 68), issue 12, pp. 1643-1652. URL: PM:2622819
- Del Sal, G.; Manfioletti, G. und Schneider, C. (1988): A one-tube plasmid DNA mini-preparation suitable for sequencing, *Nucleic Acids Res.* (volume 16), issue 20, pp. 9878. URL: PM:3186460
- Delorme, V.; Garcia, A.; Cayla, X. und Tardieux, I. (2002): A role for *Toxoplasma gondii* type 1 ser/thr protein phosphatase in host cell invasion, *Microbes.Infect.*

(volume 4), issue 3, pp. 271-278. URL: PM:11909736

Dietrich, G.; Gentschev, I.; Hess, J.; Ulmer, J. B.; Kaufmann, S. H. und Goebel, W. (1999): Delivery of DNA vaccines by attenuated intracellular bacteria, *Immunol.Today* (volume 20), issue 6, pp. 251-253. URL: PM:10354548

Doerig, C.; Meijer, L. und Mottram, J. C. (2002): Protein kinases as drug targets in parasitic protozoa, *Trends Parasitol.* (volume 18), issue 8, pp. 366-371. URL: PM:12377287

Doolan, D. L. und Hoffman, S. L. (2001): DNA-based vaccines against malaria: status and promise of the Multi-Stage Malaria DNA Vaccine Operation, *Int.J.Parasitol.* (volume 31), issue 8, pp. 753-762. URL: PM:11403765

Dubremetz, J. F.; Garcia-Reguet, N.; Conseil, V. und Fourmaux, M. N. (1998): Apical organelles and host-cell invasion by *Apicomplexa*, *Int.J.Parasitol.* (volume 28), issue 7, pp. 1007-1013. URL: PM:9724870

Dzierszynski, F.; Mortuaire, M.; Cesbron-Delauw, M. F. und Tomavo, S. (2000): Targeted disruption of the glycosylphosphatidylinositol-anchored surface antigen SAG3 gene in *Toxoplasma gondii* decreases host cell adhesion and drastically reduces virulence in mice, *Mol.Microbiol.* (volume 37), issue 3, pp. 574-582. URL: PM:10931351

Ebel, T.; Middleton, J. F.; Frisch, A. und Lipp, J. (1997): Characterization of a secretory type *Theileria parva* glutaredoxin homologue identified by novel screening procedure, *J.Biol.Chem.* (volume 272), issue 5, pp. 3042-3048. URL: PM:9006954

Fantham, H. P. (1909): The sporozoan *Eimeria tenella* parasitic in the alimentary canal of the grouse, *Proc.Zool.Soc.London* (volume 2), pp. 43-44.

Feltquate, D. M.; Heaney, S.; Webster, R. G. und Robinson, H. L. (1997): Different T helper cell types and antibody isotypes generated by saline and gene gun DNA immunization, *J.Immunol.* (volume 158), issue 5, pp. 2278-2284. URL: PM:9036975

Fernando, M. A.; Lawn, A. M.; Rose, M. E. und Al Attar, M. A. (1983): Invasion of chicken caecal and intestinal lamina propria by crypt epithelial cells infected with coccidia, *Parasitology* (volume 86 (Pt 3)), pp. 391-398. URL: PM:6877865

Files, J. G.; Paul, L. S. und Gabe, J. D. (1987): Identification and characterization of the gene for a major surface antigen of *Eimeria tenella*., Agabian, N.; Goodman, H. und Noguiera, N., *Molecular strategies of parasitic invasion.* pp. 713-723, Alan R. Liss, Inc., New York.

Forns, X.; Emerson, S. U.; Tobin, G. J.; Mushahwar, I. K.; Purcell, R. H. und Bukh, J. (1999): DNA immunization of mice and macaques with plasmids encoding hepatitis C virus envelope E2 protein expressed intracellularly and on the cell surface, *Vaccine* (volume 17), issue 15-16, pp. 1992-2002. URL: PM:10217599

Foth, B. J.; Ralph, S. A.; Tonkin, C. J.; Struck, N. S.; Fraunholz, M.; Roos, D. S.; Cowman, A. F. und McFadden, G. I. (2003): Dissecting apicoplast targeting in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*, *Science* (volume 299), issue 5607, pp. 705-708. URL: PM:12560551

Fynan, E. F.; Webster, R. G.; Fuller, D. H.; Haynes, J. R.; Santoro, J. C. und Robinson, H. L. (1993): DNA vaccines: protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (volume 90), issue 24, pp. 11478-11482. URL: PM:8265577

Galliciotti, G.; Schneider, H.; Wyder, L.; Vitaliti, A.; Wittmer, M.; Ajmo, M. und Klemenz, R. (2001): Signal-sequence trap in mammalian and yeast cells: a comparison, *J.Membr.Biol.* (volume 183), issue 3, pp. 175-182. URL: PM:11696859

Gehre, F (2004): Studien zur DNA-Immunisierung von Hühnern, Diplomarbeit in Vorbereitung, Humboldt-Universität zu Berlin.

Gentschev, I.; Dietrich, G.; Spreng, S.; Kolb-Maurer, A.; Daniels, J.; Hess, J.;

Kaufmann, S. H. und Goebel, W. (2000): Delivery of protein antigens and DNA by virulence-attenuated strains of *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes*, J.Biotechnol. (volume 83), issue 1-2, pp. 19-26. URL: PM:11000455

Gish, W. und States, D. J. (1993): Identification of protein coding regions by database similarity search, Nat.Genet. (volume 3), issue 3, pp. 266-272. URL: PM:8485583

Glockner, G.; Eichinger, L.; Szafranski, K.; Pachebat, J. A.; Bankier, A. T.; Dear, P. H.; Lehmann, R.; Baumgart, C.; Parra, G.; Abril, J. F.; Guigo, R.; Kumpf, K.; Tunggal, B.; Cox, E.; Quail, M. A.; Platzer, M.; Rosenthal, A. und Noegel, A. A. (2002): Sequence and analysis of chromosome 2 of *Dictyostelium discoideum*, Nature (volume 418), issue 6893, pp. 79-85. URL: PM:12097910

Gobel, T. W.; Kaspers, B. und Stangassinger, M. (2001): NK and T cells constitute two major, functionally distinct intestinal epithelial lymphocyte subsets in the chicken, Int.Immunol. (volume 13), issue 6, pp. 757-762. URL: PM:11369702

Gobel, T. W.; Schneider, K.; Schaerer, B.; Mejri, I.; Puehler, F.; Weigend, S.; Staeheli, P. und Kaspers, B. (2003): IL-18 stimulates the proliferation and IFN-gamma release of CD4+ T cells in the chicken: conservation of a Th1-like system in a nonmammalian species, J.Immunol. (volume 171), issue 4, pp. 1809-1815. URL: PM:12902481

Goo, J. H.; Ahn, Y.; Park, O. K. und Park, W. J. (1999): Selection of Drosophila genes encoding secreted and membrane proteins, Mol.Cells (volume 9), issue 5, pp. 564-568. URL: PM:10597048

Gurunathan, S.; Klinman, D. M. und Seder, R. A. (2000): DNA vaccines: immunology, application, and optimization, Annu.Rev.Immunol. (volume 18), pp. 927-974. URL: PM:10837079

Gurunathan, S.; Sacks, D. L.; Brown, D. R.; Reiner, S. L.; Charest, H.; Glaichenhaus, N. und Seder, R. A. (1997): Vaccination with DNA encoding the immunodominant LACK parasite antigen confers protective immunity to mice infected with *Leishmania major*, J.Exp.Med. (volume 186), issue 7, pp. 1137-1147. URL: PM:9314562

Haddad, D.; Liljeqvist, S.; Stahl, S.; Perlmann, P.; Berzins, K. und Ahlborg, N. (1998): Differential induction of immunoglobulin G subclasses by immunization with DNA vectors containing or lacking a signal sequence, Immunol.Lett. (volume 61), issue 2-3, pp. 201-204. URL: PM:9657276

Hanke, T.; Samuel, R. V.; Blanchard, T. J.; Neumann, V. C.; Allen, T. M.; Boyson, J. E.; Sharpe, S. A.; Cook, N.; Smith, G. L.; Watkins, D. I.; Cranage, M. P. und McMichael, A. J. (1999): Effective induction of simian immunodeficiency virus-specific cytotoxic T lymphocytes in macaques by using a multiepitope gene and DNA prime-modified vaccinia virus Ankara boost vaccination regimen, J.Virol. (volume 73), issue 9, pp. 7524-7532. URL: PM:10438842

Harlow, E. und Lane, D. (1988): Antibodies. A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

Hartikka, J.; Sawdey, M.; Cornefert-Jensen, F.; Margalith, M.; Barnhart, K.; Nolasco, M.; Vahlsing, H. L.; Meek, J.; Marquet, M.; Hobart, P.; Norman, J. und Manthorpe, M. (1996): An improved plasmid DNA expression vector for direct injection into skeletal muscle, Hum.Gene Ther. (volume 7), issue 10, pp. 1205-1217. URL: PM:8793545

Harvey, T. J.; Macnaughton, T. B. und Gowans, E. J. (1997): The development and characterisation of a SV40 T-antigen positive cell line of human hepatic origin, J.Virol.Methods (volume 65), issue 1, pp. 67-74. URL: PM:9128863

Hausmann, K. und Hülsmann, N (1996): Protozoology, 2nd. edition, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

He, X. L.; Grigg, M. E.; Boothroyd, J. C. und Garcia, K. C. (2002): Structure of the immunodominant surface antigen from the *Toxoplasma gondii* SRS superfamily,

Nat.Struct.Biol. (volume 9), issue 8, pp. 606-611. URL: PM:12091874

Hehl, A.; Krieger, T. und Boothroyd, J. C. (1997): Identification and characterization of SRS1, a *Toxoplasma gondii* surface antigen upstream of and related to SAG1, Mol.Biochem.Parasitol. (volume 89), issue 2, pp. 271-282. URL: PM:9364971

Hehl, A. B.; Lekutis, C.; Grigg, M. E.; Bradley, P. J.; Dubremetz, J. F.; Ortega-Barria, E. und Boothroyd, J. C. (2000): *Toxoplasma gondii* homologue of plasmodium apical membrane antigen 1 is involved in invasion of host cells, Infect.Immun. (volume 68), issue 12, pp. 7078-7086. URL: PM:11083833

Heriveau, C.; Dimier-Poisson, I.; Lowenthal, J.; Naciri, M. und Quere, P. (2000): Inhibition of *Eimeria tenella* replication after recombinant IFN-gamma activation in chicken macrophages, fibroblasts and epithelial cells, Vet.Parasitol. (volume 92), issue 1, pp. 37-49. URL: PM:10936544

Higashijima, S.; Nose, A.; Eguchi, G.; Hotta, Y. und Okamoto, H. (1997): Mindin/F-spondin family: novel ECM proteins expressed in the zebrafish embryonic axis, Dev.Biol. (volume 192), issue 2, pp. 211-227. URL: PM:9441663

Higgins, D. A. (1996): Comparative immunology of avian species, Davison, T. F.; Morris, T. R. und Payne, L. N, Poultry Immunology. (volume 24), Darfax Publishing Company, Abington.

Hoff, E. F.; Cook, S. H.; Sherman, G. D.; Harper, J. M.; Ferguson, D. J.; Dubremetz, J. F. und Carruthers, V. B. (2001): *Toxoplasma gondii*: molecular cloning and characterization of a novel 18-kDa secretory antigen, TgMIC10, Exp.Parasitol. (volume 97), issue 2, pp. 77-88. URL: PM:11281704

Hoffmeister, B.; Kiecker, F.; Tesfa, L.; Volk, H. D.; Picker, L. J. und Kern, F. (2003): Mapping T cell epitopes by flow cytometry, Methods (volume 29), issue 3, pp. 270-281. URL: PM:12725792

Hulse, D. J. und Romero, C. H. (2004): Partial protection against infectious bursal disease virus through DNA-mediated vaccination with the VP2 capsid protein and chicken IL-2 genes, Vaccine (volume 22), issue 9-10, pp. 1249-1259. URL: PM:15003654

Inoue, H.; Nojima, H. und Okayama, H. (1990): High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids, Gene (volume 96), issue 1, pp. 23-28. URL: PM:2265755

Jacobs, K. A.; Collins-Racie, L. A.; Colbert, M.; Duckett, M.; Evans, C.; Golden-Fleet, M.; Kelleher, K.; Kriz, R.; La Vallie, E. R.; Merberg, D.; Spaulding, V.; Stover, J.; Williamson, M. J. und McCoy, J. M. (1999): A genetic selection for isolating cDNA clones that encode signal peptides, Methods Enzymol. (volume 303), pp. 468-479. URL: PM:10349660

Jacobs, K. A.; Collins-Racie, L. A.; Colbert, M.; Duckett, M.; Golden-Fleet, M.; Kelleher, K.; Kriz, R.; LaVallie, E. R.; Merberg, D.; Spaulding, V.; Stover, J.; Williamson, M. J. und McCoy, J. M. (1997): A genetic selection for isolating cDNAs encoding secreted proteins, Gene (volume 198), issue 1-2, pp. 289-296. URL: PM:9370294

Jenkins, M. C. (1998): Progress on developing a recombinant coccidiosis vaccine, Int.J.Parasitol. (volume 28), issue 7, pp. 1111-1119. URL: PM:9724882

Jenkins, M. C.; Augustine, P. C.; Barta, J. R.; Castle, M. D. und Danforth, H. D. (1991a): Development of resistance to coccidiosis in the absence of merogonic development using X-irradiated *Eimeria acervulina* oocysts, Exp.Parasitol. (volume 72), issue 3, pp. 285-293. URL: PM:2015867

Jenkins, M. C.; Augustine, P. C.; Danforth, H. D. und Barta, J. R. (1991b): X-irradiation of *Eimeria tenella* oocysts provides direct evidence that sporozoite invasion and early schizont development induce a protective immune response(s),

Infect.Immun. (volume 59), issue 11, pp. 4042-4048. URL: PM:1937763

Jenkins, M. C.; Seferian, P. G.; Augustine, P. C. und Danforth, H. D. (1993): Protective immunity against coccidiosis elicited by radiation-attenuated *Eimeria maxima* sporozoites that are incapable of asexual development, Avian Dis. (volume 37), issue 1, pp. 74-82. URL: PM:8452512

Joiner, K. A. und Roos, D. S. (2002): Secretory traffic in the eukaryotic parasite *Toxoplasma gondii*: less is more, J.Cell Biol. (volume 157), issue 4, pp. 557-563. URL: PM:12011107

Jung, C.; Lee, C. Y. und Grigg, M. E. (2004): The SRS superfamily of *Toxoplasma* surface proteins, Int.J.Parasitol. (volume 34), issue 3, pp. 285-296. URL: PM:15003490

Kageyama, T.; Tanabe, K. und Koiwai, O. (1991): Development-dependent expression of isozymogens of monkey pepsinogens and structural differences between them, Eur.J.Biochem. (volume 202), issue 1, pp. 205-215. URL: PM:1935977

Kai, M.; Wada, I.; Imai, S.; Sakane, F. und Kanoh, H. (1996): Identification and cDNA cloning of 35-kDa phosphatidic acid phosphatase (type 2) bound to plasma membranes. Polymerase chain reaction amplification of mouse H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-inducible hic53 clone yielded the cDNA encoding phosphatidic acid phosphatase, J.Biol.Chem. (volume 271), issue 31, pp. 18931-18938. URL: PM:8702556

Kai, M.; Wada, I.; Imai, S.; Sakane, F. und Kanoh, H. (1997): Cloning and characterization of two human isozymes of Mg<sup>2+</sup>-independent phosphatidic acid phosphatase, J.Biol.Chem. (volume 272), issue 39, pp. 24572-24578. URL: PM:9305923

Kaiser, C. A. und Botstein, D. (1986): Secretion-defective mutations in the signal sequence for *Saccharomyces cerevisiae* invertase, Mol.Cell Biol. (volume 6), issue 7, pp. 2382-2391. URL: PM:3537718

Kaiser, C. A.; Preuss, D.; Grisafi, P. und Botstein, D. (1987): Many random sequences functionally replace the secretion signal sequence of yeast invertase, Science (volume 235), issue 4786, pp. 312-317. URL: PM:3541205

Kaminski, W. E.; Piehler, A.; Pullmann, K.; Porsch-Ozcurumez, M.; Duong, C.; Bared, G. M.; Buchler, C. und Schmitz, G. (2001): Complete coding sequence, promoter region, and genomic structure of the human ABCA2 gene and evidence for sterol-dependent regulation in macrophages, Biochem.Biophys.Res.Comm. (volume 281), issue 1, pp. 249-258. URL: PM:11178988

Kaneko, T.; Nakamura, Y.; Wolk, C. P.; Kuritz, T.; Sasamoto, S.; Watanabe, A.; Iriguchi, M.; Ishikawa, A.; Kawashima, K.; Kimura, T.; Kishida, Y.; Kohara, M.; Matsumoto, M.; Matsuno, A.; Muraki, A.; Nakazaki, N.; Shimpō, S.; Sugimoto, M.; Takazawa, M.; Yamada, M.; Yasuda, M. und Tabata, S. (2001): Complete genomic sequence of the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120, DNA Res. (volume 8), issue 5, pp. 205-213. URL: PM:11759840

Kang, Y.; Calvo, P. A.; Daly, T. M. und Long, C. A. (1998): Comparison of humoral immune responses elicited by DNA and protein vaccines based on merozoite surface protein-1 from *Plasmodium yoelii*, a rodent malaria parasite, J.Immunol. (volume 161), issue 8, pp. 4211-4219. URL: PM:9780195

Kappe, S.; Bruderer, T.; Gantt, S.; Fujioka, H.; Nussenzweig, V. und Menard, R. (1999): Conservation of a gliding motility and cell invasion machinery in Apicomplexan parasites, J.Cell Biol. (volume 147), issue 5, pp. 937-944. URL: PM:10579715

Kappe, S. H.; Gardner, M. J.; Brown, S. M.; Ross, J.; Matuschewski, K.; Ribeiro, J. M.; Adams, J. H.; Quackenbush, J.; Cho, J.; Carucci, D. J.; Hoffman, S. L. und

Nussenzweig, V. (2001): Exploring the transcriptome of the malaria sporozoite stage, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A (volume 98), issue 17, pp. 9895-9900. URL: PM:11493695

Kasper, L.; Courret, N.; Darche, S.; Luangsay, S.; Mennechet, F.; Minns, L.; Rachinel, N.; Ronet, C. und Buzoni-Gatel, D. (2004): *Toxoplasma gondii* and mucosal immunity, Int.J.Parasitol. (volume 34), issue 3, pp. 401-409. URL: PM:15003499

Keitel, W. A.; Kester, K. E.; Atmar, R. L.; White, A. C.; Bond, N. H.; Holland, C. A.; Krzych, U.; Palmer, D. R.; Egan, A.; Diggs, C.; Ballou, W. R.; Hall, B. F. und Kaslow, D. (1999): Phase I trial of two recombinant vaccines containing the 19kd carboxy terminal fragment of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 (msp-1(19)) and T helper epitopes of tetanus toxoid, Vaccine (volume 18), issue 5-6, pp. 531-539. URL: PM:10519944

Kester, K. E.; McKinney, D. A.; Tornieporth, N.; Ockenhouse, C. F.; Heppner, D. G.; Hall, T.; Krzych, U.; Delchambre, M.; Voss, G.; Dowler, M. G.; Palensky, J.; Wittes, J.; Cohen, J. und Ballou, W. R. (2001): Efficacy of recombinant circumsporozoite protein vaccine regimens against experimental *Plasmodium falciparum* malaria, J.Infect.Dis. (volume 183), issue 4, pp. 640-647. URL: PM:11170991

Kieschnick, H.; Wakefield, T.; Narducci, C. A. und Beckers, C. (2001): *Toxoplasma gondii* attachment to host cells is regulated by a calmodulin-like domain protein kinase, J.Biol.Chem. (volume 276), issue 15, pp. 12369-12377. URL: PM:11154702

Kim, J. J.; Trivedi, N. N.; Nottingham, L. K.; Morrison, L.; Tsai, A.; Hu, Y.; Mahalingam, S.; Dang, K.; Ahn, L.; Doyle, N. K.; Wilson, D. M.; Chattergoon, M. A.; Chalian, A. A.; Boyer, J. D.; Agadjanyan, M. G. und Weiner, D. B. (1998): Modulation of amplitude and direction of in vivo immune responses by co-administration of cytokine gene expression cassettes with DNA immunogens, Eur.J.Immunol. (volume 28), issue 3, pp. 1089-1103. URL: PM:9541605

Kim, K. und Weiss, L. M. (2004): *Toxoplasma gondii*: the model apicomplexan, Int.J.Parasitol. (volume 34), issue 3, pp. 423-432. URL: PM:15003501

Kim, K. S.; Jenkins, M. C. und Lillehoj, H. S. (1989): Immunization of chickens with live *Escherichia coli* expressing *Eimeria acervulina* merozoite recombinant antigen induces partial protection against coccidiosis, Infect.Immun. (volume 57), issue 8, pp. 2434-2440. URL: PM:2663723

Kirk, K. (2004): Channels and transporters as drug targets in the Plasmodium-infected erythrocyte, Acta Trop. (volume 89), issue 3, pp. 285-298. URL: PM:14744555

Klein, R. D.; Gu, Q.; Goddard, A. und Rosenthal, A. (1996): Selection for genes encoding secreted proteins and receptors, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A (volume 93), issue 14, pp. 7108-7113. URL: PM:8692953

Kocken, C. H.; Narum1 DL; Massougbodji, A.; Ayivi, B.; Dubbeld, M. A.; van der, Wel A.; Conway, D. J.; Sanni, A. und Thomas, A. W. (2000): Molecular characterisation of *Plasmodium reichenowi* apical membrane antigen-1 (AMA-1), comparison with *P. falciparum* AMA-1, and antibody-mediated inhibition of red cell invasion, Mol.Biochem.Parasitol. (volume 109), issue 2, pp. 147-156. URL: PM:10960173

Kodihalli, S.; Haynes, J. R.; Robinson, H. L. und Webster, R. G. (1997): Cross-protection among lethal H5N2 influenza viruses induced by DNA vaccine to the hemagglutinin, J.Virol. (volume 71), issue 5, pp. 3391-3396. URL: PM:9094608

Kopko, S. H.; Martin, D. S. und Barta, J. R. (2000): Responses of chickens to a recombinant refractile body antigen of *Eimeria tenella* administered using various immunizing strategies, Poult.Sci. (volume 79), issue 3, pp. 336-342. URL: PM:10735199

Kramer, R. A.; Tomchak, L. A.; McAndrew, S. J.; Becker, K.; Hug, D.; Pasamontes, L.

und Humbelin, M. (1993): An *Eimeria tenella* gene encoding a protein with homology to the nucleotide transhydrogenases of *Escherichia coli* and bovine mitochondria, Mol.Biochem.Parasitol. (volume 60), issue 2, pp. 327-331. URL: PM:8232423

Kremer, L.; Dupre, L.; Wolowczuk, I. und Loch, C. (1999): *In vivo* immunomodulation following intradermal injection with DNA encoding IL-18, J.Immunol. (volume 163), issue 6, pp. 3226-3231. URL: PM:10477591

Krungkrai, J.; Krungkrai, S. R.; Suraveratun, N. und Prapunwattana, P. (1997): Mitochondrial ubiquinol-cytochrome c reductase and cytochrome c oxidase: chemotherapeutic targets in malarial parasites, Biochem.Mol.Biol.Int. (volume 42), issue 5, pp. 1007-1014. URL: PM:9285069

Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature (volume 227), issue 259, pp. 680-685. URL: PM:5432063

Lawn, A. M. und Rose, M. E. (1982): Mucosal transport of *Eimeria tenella* in the cecum of the chicken, J.Parasitol. (volume 68), issue 6, pp. 1117-1123. URL: PM:7175614

Lee, S. J. (1991): Expression of growth/differentiation factor 1 in the nervous system: conservation of a bicistronic structure, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A (volume 88), issue 10, pp. 4250-4254. URL: PM:2034669

Lekutis, C.; Ferguson, D. J.; Grigg, M. E.; Camps, M. und Boothroyd, J. C. (2001): Surface antigens of *Toxoplasma gondii*: variations on a theme, Int.J.Parasitol. (volume 31), issue 12, pp. 1285-1292. URL: PM:11566296

Lewis, P. J.; van Drunen Littel-Van Den Hurk und Babiuk, L. A. (1999): Altering the cellular location of an antigen expressed by a DNA-based vaccine modulates the immune response, J.Virol. (volume 73), issue 12, pp. 10214-10223. URL: PM:10559338

Li, L.; Brunk, B. P.; Kissinger, J. C.; Pape, D.; Tang, K.; Cole, R. H.; Martin, J.; Wylie, T.; Dante, M.; Fogarty, S. J.; Howe, D. K.; Liberator, P.; Diaz, C.; Anderson, J.; White, M.; Jerome, M. E.; Johnson, E. A.; Radke, J. A.; Stoeckert, C. J., Jr.; Waterston, R. H.; Clifton, S. W.; Roos, D. S. und Sibley, L. D. (2003): Gene discovery in the apicomplexa as revealed by EST sequencing and assembly of a comparative gene database, Genome Res. (volume 13), issue 3, pp. 443-454. URL: PM:12618375

Liberator, P. A.; Hsu, J. und Turner, M. J. (1989): Tandem trinucleotide repeats throughout the nucleotide sequence of a cDNA encoding an *Eimeria tenella* sporozoite antigen, Nucleic Acids Res. (volume 17), issue 17, pp. 7104. URL: PM:2780319

Lillehoj, H. S. (1994): Analysis of *Eimeria acervulina*-induced changes in the intestinal T lymphocyte subpopulations in two chicken strains showing different levels of susceptibility to coccidiosis, Res.Vet.Sci. (volume 56), issue 1, pp. 1-7. URL: PM:7908452

Lillehoj, H. S. (1998): Role of T lymphocytes and cytokines in coccidiosis, Int.J.Parasitol. (volume 28), issue 7, pp. 1071-1081. URL: PM:9724878

Lillehoj, H. S. und Choi, K. D. (1998): Recombinant chicken IFN-gamma-mediated inhibition of *Eimeria tenella* development in vitro and reduction of oocyst production and body weight loss following *Eimeria acervulina* challenge infection, Avian Dis. (volume 42), issue 2, pp. 307-314. URL: PM:9645322

Lillehoj, H. S.; Choi, K. D.; Jenkins, M. C.; Vakharia, V. N.; Song, K. D.; Han, J. Y. und Lillehoj, E. P. (2000): A recombinant *Eimeria* protein inducing IFN-gamma production: comparison of different gene expression systems and immunization strategies for vaccination against coccidiosis, Avian Dis. (volume 44), issue 2, pp.



379-389. URL: PM:10879919

Lillehoj, H. S.; Lindblad, E. B. und Nichols, M. (1993): Adjuvanticity of dimethyl dioctadecyl ammonium bromide, complete Freund's adjuvant and *Corynebacterium parvum* with respect to host immune response to coccidial antigens, Avian Dis. (volume 37), issue 3, pp. 731-740. URL: PM:8257364

Lillehoj, H. S. und Trout, J. M. (1994): CD8(+) T cell-coccidia interactions, Parasitol.Today (volume 10), issue 1, pp. 10-14. URL: PM:15275557

Lillehoj, H. S. und Trout, J. M. (1996): Avian gut-associated lymphoid tissues and intestinal immune responses to *Eimeria* parasites, Clin.Microbiol.Rev. (volume 9), issue 3, pp. 349-360. URL: PM:8809465

Long, P. L. (1993): Avian Coccidiosis, Kreier, J. P., Parasitic Protozoa , 2. edition, Academic Press, San Diego.

Lowenthal, J. W.; York, J. J.; O'Neil, T. E.; Rhodes, S.; Prowse, S. J.; Strom, D. G. und Digby, M. R. (1997): *In vivo* effects of chicken IFN-gamma during infection with *Eimeria*, J.Interferon Cytokine Res. (volume 17), issue 9, pp. 551-558. URL: PM:9335433

Lucius, R. und Loos-Frank, B. (1997): Parasitologie: Grundlagen für Biologen, Mediziner und Veterinärmediziner, Spektrum Akademischer Verlag, Berlin, Heidelberg.

Manger, I. D.; Hehl, A. B. und Boothroyd, J. C. (1998): The surface of *Toxoplasma* tachyzoites is dominated by a family of glycosylphosphatidylinositol-anchored antigens related to SAG1, Infect.Immun. (volume 66), issue 5, pp. 2237-2244. URL: PM:9573113

McConkey, S. J.; Reece, W. H.; Moorthy, V. S.; Webster, D.; Dunachie, S.; Butcher, G.; Vuola, J. M.; Blanchard, T. J.; Gothard, P.; Watkins, K.; Hannan, C. M.; Everaere, S.; Brown, K.; Kester, K. E.; Cummings, J.; Williams, J.; Heppner, D. G.; Pathan, A.; Flanagan, K.; Arulanantham, N.; Roberts, M. T.; Roy, M.; Smith, G. L.; Schneider, J.; Peto, T.; Sinden, R. E.; Gilbert, S. C. und Hill, A. V. (2003): Enhanced T-cell immunogenicity of plasmid DNA vaccines boosted by recombinant modified vaccinia virus Ankara in humans, Nat.Med. (volume 9), issue 6, pp. 729-735. URL: PM:12766765

McCulloch, R. (2004): Antigenic variation in African trypanosomes: monitoring progress, Trends Parasitol. (volume 20), issue 3, pp. 117-121. URL: PM:15036032

McDonald, V. (1999): Gut intraepithelial lymphocytes and immunity to Coccidia, Parasitol.Today (volume 15), issue 12, pp. 483-487. URL: PM:10557148

Medina, E. und Guzman, C. A. (2001): Use of live bacterial vaccine vectors for antigen delivery: potential and limitations, Vaccine (volume 19), issue 13-14, pp. 1573-1580. URL: PM:11166877

Meissner, M.; Reiss, M.; Viebig, N.; Carruthers, V. B.; Toursel, C.; Tomavo, S.; Ajioka, J. W. und Soldati, D. (2002): A family of transmembrane microneme proteins of *Toxoplasma gondii* contain EGF-like domains and function as escorters, J.Cell Sci. (volume 115), issue Pt 3, pp. 563-574. URL: PM:11861763

Melby, P. C.; Ogden, G. B.; Flores, H. A.; Zhao, W.; Geldmacher, C.; Biediger, N. M.; Ahuja, S. K.; Uranga, J. und Melendez, M. (2000): Identification of vaccine candidates for experimental visceral leishmaniasis by immunization with sequential fractions of a cDNA expression library, Infect.Immun. (volume 68), issue 10, pp. 5595-5602. URL: PM:10992459

Miller, G. A.; Bhogal, B. S.; McCandliss, R.; Strausberg, R. L.; Jessee, E. J.; Anderson, A. C.; Fuchs, C. K.; Nagle, J.; Likel, M. H.; Strasser, J. M. und . (1989): Characterization and vaccine potential of a novel recombinant coccidial antigen, Infect.Immun. (volume 57), issue 7, pp. 2014-2020. URL: PM:2659532

Miller, J. F. (1994): Bacterial transformation by electroporation, *Methods Enzymol.* (volume 235), pp. 375-385. URL: PM:8057910

Min, W.; Lillehoj, H. S.; Burnside, J.; Weining, K. C.; Staeheli, P. und Zhu, J. J. (2001): Adjuvant effects of IL-1beta, IL-2, IL-8, IL-15, IFN-alpha, IFN-gamma TGF-beta4 and lymphotactin on DNA vaccination against *Eimeria acervulina*, *Vaccine* (volume 20), issue 1-2, pp. 267-274. URL: PM:11567773

Mollenkopf, H. J.; Groine-Triebkorn, D.; Andersen, P.; Hess, J. und Kaufmann, S. H. (2001): Protective efficacy against tuberculosis of ESAT-6 secreted by a live *Salmonella typhimurium* vaccine carrier strain and expressed by naked DNA, *Vaccine* (volume 19), issue 28-29, pp. 4028-4035. URL: PM:11427279

Moore, R. J.; Lenghaus, C.; Sheedy, S. A. und Doran, T. J. (2001): Improved vectors for expression library immunization - application to *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs, *Vaccine* (volume 20), issue 1-2, pp. 115-120. URL: PM:11567754

Moorthy, V. S.; Good, M. F. und Hill, A. V. (2004a): Malaria vaccine developments, *Lancet* (volume 363), issue 9403, pp. 150-156. URL: PM:14726170

Moorthy, V. S.; Imoukhuede, E. B.; Keating, S.; Pinder, M.; Webster, D.; Skinner, M. A.; Gilbert, S. C.; Walraven, G. und Hill, A. V. (2004b): Phase 1 evaluation of 3 highly immunogenic prime-boost regimens, including a 12-month reboosting vaccination, for malaria vaccination in Gambian men, *J.Infect.Dis.* (volume 189), issue 12, pp. 2213-2219. URL: PM:15181568

Mora-Garcia, S.; Vert, G.; Yin, Y.; Cano-Delgado, A.; Cheong, H. und Chory, J. (2004): Nuclear protein phosphatases with Kelch-repeat domains modulate the response to brassinosteroids in *Arabidopsis*, *Genes Dev.* (volume 18), issue 4, pp. 448-460. URL: PM:14977918

Morel, P. A.; Falkner, D.; Plowey, J.; Larregina, A. T. und Falo, L. D. (2004): DNA immunisation: altering the cellular localisation of expressed protein and the immunisation route allows manipulation of the immune response, *Vaccine* (volume 22), issue 3-4, pp. 447-456. URL: PM:14670327

Morrot, A. und Zavala, F. (2004): Effector and memory CD8+ T cells as seen in immunity to malaria, *Immunol.Rev.* (volume 201), pp. 291-303. URL: PM:15361248

Morrow, C. D.; Novak, M. J.; Ansardi, D. C.; Porter, D. C. und Moldoveanu, Z. (1999): Recombinant viruses as vectors for mucosal immunity, *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* (volume 236), pp. 255-273. URL: PM:9893364

Musembi, S.; Janoo, R.; Sohanpal, B.; Ochanda, H.; ole-Moiyoi, O.; Bishop, R. und Nene, V. (2000): Screening for *Theileria parva* secretory gene products by functional analysis in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol.Biochem.Parasitol.* (volume 109), issue 1, pp. 81-87. URL: PM:10924760

Mustafa, A. S.; Lundin, K. E. und Oftung, F. (1998): Isolation of recombinant phage clones expressing mycobacterial T cell antigens by screening a recombinant DNA library with human CD4+ Th1 clones, *FEMS Immunol.Med.Microbiol.* (volume 22), issue 3, pp. 205-216. URL: PM:9848681

Nam, Y.; Aster, J. C. und Blacklow, S. C. (2002): Notch signaling as a therapeutic target, *Curr.Opin.Chem.Biol.* (volume 6), issue 4, pp. 501-509. URL: PM:12133727

Nash, T. E. (2002): Surface antigenic variation in *Giardia lamblia*, *Mol.Microbiol.* (volume 45), issue 3, pp. 585-590. URL: PM:12139606

Ng, S. T.; Sanusi, Jangi M.; Shirley, M. W.; Tomley, F. M. und Wan, K. L. (2002): Comparative EST analyses provide insights into gene expression in two asexual developmental stages of *Eimeria tenella*, *Exp.Parasitol.* (volume 101), issue 2-3, pp. 168-173. URL: PM:12427472

Ngo, H. M.; Hoppe, H. C. und Joiner, K. A. (2000): Differential sorting and post-secretory targeting of proteins in parasitic invasion, *Trends Cell Biol.* (volume 10),

issue 2, pp. 67-72. URL: PM:10652517

Nielsen, H.; Engelbrecht, J.; Brunak, S. und von Heijne, G. (1997): Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites, *Protein Eng* (volume 10), issue 1, pp. 1-6. URL: PM:9051728

Nielsen, H. und Krogh, A. (1998): Prediction of signal peptides and signal anchors by a hidden Markov model, *Proc.Int.Conf.Intell.Syst.Mol.Biol.* (volume 6), pp. 122-130. URL: PM:9783217

Nielsen, H. V.; Lauemoller, S. L.; Christiansen, L.; Buus, S.; Fomsgaard, A. und Petersen, E. (1999): Complete protection against lethal *Toxoplasma gondii* infection in mice immunized with a plasmid encoding the SAG1 gene, *Infect.Immun.* (volume 67), issue 12, pp. 6358-6363. URL: PM:10569750

Ohta, N.; Lane, T.; Ninfa, E. G.; Sommer, J. M. und Newton, A. (1992): A histidine protein kinase homologue required for regulation of bacterial cell division and differentiation, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (volume 89), issue 21, pp. 10297-10301. URL: PM:1438215

Opitz, C. und Soldati, D. (2002): 'The glideosome': a dynamic complex powering gliding motion and host cell invasion by *Toxoplasma gondii*, *Mol.Microbiol.* (volume 45), issue 3, pp. 597-604. URL: PM:12139608

Oshop, G. L.; Elankumaran, S. und Heckert, R. A. (2002): DNA vaccination in the avian, *Vet.Immunol.Immunopathol.* (volume 89), issue 1-2, pp. 1-12. URL: PM:12208046

Ovington, K. S.; Alleva, L. M. und Kerr, E. A. (1995): Cytokines and immunological control of *Eimeria spp.*, *Int.J.Parasitol.* (volume 25), issue 11, pp. 1331-1351. URL: PM:8635884

Pertmer, T. M.; Eisenbraun, M. D.; McCabe, D.; Prayaga, S. K.; Fuller, D. H. und Haynes, J. R. (1995): Gene gun-based nucleic acid immunization: elicitation of humoral and cytotoxic T lymphocyte responses following epidermal delivery of nanogram quantities of DNA, *Vaccine* (volume 13), issue 15, pp. 1427-1430. URL: PM:8578820

Pertmer, T. M.; Roberts, T. R. und Haynes, J. R. (1996): Influenza virus nucleoprotein-specific immunoglobulin G subclass and cytokine responses elicited by DNA vaccination are dependent on the route of vector DNA delivery, *J.Virol.* (volume 70), issue 9, pp. 6119-6125. URL: PM:8709236

Petcherski, A. G. und Kimble, J. (2000): LAG-3 is a putative transcriptional activator in the *C. elegans* Notch pathway, *Nature* (volume 405), issue 6784, pp. 364-368. URL: PM:10830967

Pogonka, T.; Klotz, C.; Kovacs, F. und Lucius, R. (2003): A single dose of recombinant *Salmonella typhimurium* induces specific humoral immune responses against heterologous *Eimeria tenella* antigens in chicken, *Int.J.Parasitol.* (volume 33), issue 1, pp. 81-88. URL: PM:12547349

Profous-Juchelka, H.; Liberator, P. und Turner, M. (1988): Identification and characterization of cDNA clones encoding antigens of *Eimeria tenella*, *Mol.Biochem.Parasitol.* (volume 30), issue 3, pp. 233-241. URL: PM:2972928

Prowse, S. J. (1991): Cell-mediated immunity to *Eimeria* in the fowl: the absence of cross-species protection is not due to the lack of cross-reactive T cells, *Int.J.Parasitol.* (volume 21), issue 1, pp. 133-135. URL: PM:1828244

Quinn, A.; Jiang, W.; Velaz-Faircloth, M.; Cobb, A. J.; Henry, S. C. und Frothingham, R. (2002): *In vivo* protein expression and immune responses generated by DNA vaccines expressing mycobacterial antigens fused with a reporter protein, *Vaccine* (volume 20), issue 25-26, pp. 3187-3192. URL: PM:12163270

Rainczuk, A.; Scorza, T.; Smooker, P. M. und Spithill, T. W. (2003): Induction of

specific T-cell responses, opsonizing antibodies, and protection against *Plasmodium chabaudi adami* infection in mice vaccinated with genomic expression libraries expressed in targeted and secretory DNA vectors, *Infect.Immun.* (volume 71), issue 8, pp. 4506-4515. URL: PM:12874330

Ramirez, J. R.; Gilchrist, K.; Robledo, S.; Sepulveda, J. C.; Moll, H.; Soldati, D. und Berberich, C. (2001): Attenuated *Toxoplasma gondii* ts-4 mutants engineered to express the Leishmania antigen KMP-11 elicit a specific immune response in BALB/c mice, *Vaccine* (volume 20), issue 3-4, pp. 455-461. URL: PM:11672909

Raz, R.; Cretin, C.; Puigdomenech, P. und Martinez-Izquierdo, J. A. (1991): The sequence of a hydroxyproline-rich glycoprotein gene from *Sorghum vulgare*, *Plant Mol.Biol.* (volume 16), issue 2, pp. 365-367. URL: PM:1893107

Refega, S.; Girard-Misguich, F.; Bourdieu, C.; Pery, P. und Labbe, M. (2003): Gene discovery in *Eimeria tenella* by immunoscreening cDNA expression libraries of sporozoites and schizonts with chicken intestinal antibodies, *Vet.Parasitol.* (volume 113), issue 1, pp. 19-33. URL: PM:12651215

Roberts, S. J.; Smith, A. L.; West, A. B.; Wen, L.; Findly, R. C.; Owen, M. J. und Hayday, A. C. (1996): T-cell alphabeta and gammadelta deficient mice display abnormal but distinct phenotypes toward a natural, widespread infection of the intestinal epithelium, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (volume 93), issue 21, pp. 11774-11779. URL: PM:8876213

Robinson, H. L.; Hunt, L. A. und Webster, R. G. (1993): Protection against a lethal influenza virus challenge by immunization with a haemagglutinin-expressing plasmid DNA, *Vaccine* (volume 11), issue 9, pp. 957-960. URL: PM:8212843

Robinson, H. L.; Montefiori, D. C.; Johnson, R. P.; Manson, K. H.; Kalish, M. L.; Lifson, J. D.; Rizvi, T. A.; Lu, S.; Hu, S. L.; Mazzara, G. P.; Panicali, D. L.; Herndon, J. G.; Glickman, R.; Candido, M. A.; Lydy, S. L.; Wyand, M. S. und McClure, H. M. (1999): Neutralizing antibody-independent containment of immunodeficiency virus challenges by DNA priming and recombinant pox virus booster immunizations, *Nat.Med.* (volume 5), issue 5, pp. 526-534. URL: PM:10229229

Robson, K. J.; Hall, J. R.; Jennings, M. W.; Harris, T. J.; Marsh, K.; Newbold, C. I.; Tate, V. E. und Weatherall, D. J. (1988): A highly conserved amino-acid sequence in thrombospondin, properdin and in proteins from sporozoites and blood stages of a human malaria parasite, *Nature* (volume 335), issue 6185, pp. 79-82. URL: PM:3045563

Rose, M. E. (1996): Immunity to Coccidia, Davison, T. F.; Morris, T. R. und Payne, L. N, *Poultry Immunology* (volume 24), Darfax Publishing Company, Abington.

Rose, M. E. und Hesketh, P. (1979): Immunity to coccidiosis: T-lymphocyte- or B-lymphocyte-deficient animals, *Infect.Immun.* (volume 26), issue 2, pp. 630-637. URL: PM:317595

Rose, M. E. und Hesketh, P. (1987): *Eimeria tenella*: effects of immunity on sporozoites within the lumen of the small intestine, *Exp.Parasitol.* (volume 63), issue 3, pp. 337-344. URL: PM:3582572

Rose, M. E.; Hesketh, P. und Wakelin, D. (1992): Immune control of murine coccidiosis: CD4+ and CD8+ T lymphocytes contribute differentially in resistance to primary and secondary infections, *Parasitology* (volume 105 ( Pt 3)), pp. 349-354. URL: PM:1361049

Rose, M. E.; Hesketh, P. und Wakelin, D. (1995): Cytotoxic effects of natural killer cells have no significant role in controlling infection with the intracellular protozoon *Eimeria vermiformis*, *Infect.Immun.* (volume 63), issue 9, pp. 3711-3714. URL: PM:7642311

Rose, M. E.; Joysey, H. S.; Hesketh, P.; Grencis, R. K. und Wakelin, D. (1988a):

Mediation of immunity to *Eimeria vermiformis* in mice by L3T4+ T cells, *Infect.Immun.* (volume 56), issue 7, pp. 1760-1765. URL: PM:2898430

Rose, M. E. und Millard, B. J. (1985): *Eimeria vermiformis*: host strains and the developmental cycle, *Exp.Parasitol.* (volume 60), issue 3, pp. 285-293. URL: PM:4076384

Rose, M. E.; Smith, A. L. und Wakelin, D. (1991a): IFN-gamma-mediated inhibition of *Eimeria vermiformis* growth in cultured fibroblasts and epithelial cells, *Infect.Immun.* (volume 59), issue 2, pp. 580-586. URL: PM:1898910

Rose, M. E.; Wakelin, D. und Hesketh, P. (1991b): IFN-gamma-mediated effects upon immunity to coccidial infections in the mouse, *Parasite Immunol.* (volume 13), issue 1, pp. 63-74. URL: PM:1901641

Rose, M. E.; Wakelin, D.; Joysey, H. S. und Hesketh, P. (1988b): Immunity to coccidiosis: adoptive transfer in NIH mice challenged with *Eimeria vermiformis*, *Parasite Immunol.* (volume 10), issue 1, pp. 59-69. URL: PM:3353129

Roy, K.; Mao, H. Q.; Huang, S. K. und Leong, K. W. (1999): Oral gene delivery with chitosan--DNA nanoparticles generates immunologic protection in a murine model of peanut allergy, *Nat.Med.* (volume 5), issue 4, pp. 387-391. URL: PM:10202926

Rush, C.; Mitchell, T. und Garside, P. (2002): Efficient priming of CD4+ and CD8+ T cells by DNA vaccination depends on appropriate targeting of sufficient levels of immunologically relevant antigen to appropriate processing pathways, *J.Immunol.* (volume 169), issue 9, pp. 4951-4960. URL: PM:12391208

Ryan, R.; Shirley, M. und Tomley, F. (2000): Mapping and expression of microneme genes in *Eimeria tenella*, *Int.J.Parasitol.* (volume 30), issue 14, pp. 1493-1499. URL: PM:11428341

Sachs, L. (1992): *Angewandte Statistik*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

Sambrook, J.; Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989): *Molecular cloning. A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Sanger, F.; Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (volume 74), issue 12, pp. 5463-5467. URL: PM:271968

Schaefer, A. E.; Scafuri, A. R.; Fredericksen, T. L. und Gilmour, D. G. (1985): Strong suppression by monocytes of T cell mitogenesis in chicken peripheral blood leukocytes, *J.Immunol.* (volume 135), issue 3, pp. 1652-1660. URL: PM:3160775

Schito, M. L. und Barta, J. R. (1997): Nonspecific immune responses and mechanisms of resistance to *Eimeria papillata* infections in mice, *Infect.Immun.* (volume 65), issue 8, pp. 3165-3170. URL: PM:9234770

Schmatz, D. M.; Crane, M. S. und Murray, P. K. (1984): Purification of *Eimeria* sporozoites by DE-52 anion exchange chromatography, *J.Protozool.* (volume 31), issue 1, pp. 181-183. URL: PM:6376788

Schneider, J.; Gilbert, S. C.; Blanchard, T. J.; Hanke, T.; Robson, K. J.; Hannan, C. M.; Becker, M.; Sinden, R.; Smith, G. L. und Hill, A. V. (1998): Enhanced immunogenicity for CD8+ T cell induction and complete protective efficacy of malaria DNA vaccination by boosting with modified vaccinia virus Ankara, *Nat.Med.* (volume 4), issue 4, pp. 397-402. URL: PM:9546783

Scorza, T.; D'Souza, S.; Laloup, M.; Dewit, J.; De Braekeleer, J.; Verschueren, H.; Vercammen, M.; Huygen, K. und Jongert, E. (2003): A GRA1 DNA vaccine primes cytolytic CD8(+) T cells to control acute *Toxoplasma gondii* infection, *Infect.Immun.* (volume 71), issue 1, pp. 309-316. URL: PM:12496180

Scott, P. und Hunter, C. A. (2002): Dendritic cells and immunity to leishmaniasis and toxoplasmosis, *Curr.Opin.Immunol.* (volume 14), issue 4, pp. 466-470. URL:

PM:12088681

- Sedegah, M.; Hedstrom, R.; Hobart, P. und Hoffman, S. L. (1994): Protection against malaria by immunization with plasmid DNA encoding circumsporozoite protein, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (volume 91), issue 21, pp. 9866-9870. URL: PM:7937907
- Sedegah, M.; Weiss, W.; Sacci, J. B., Jr.; Charoenvit, Y.; Hedstrom, R.; Gowda, K.; Majam, V. F.; Tine, J.; Kumar, S.; Hobart, P. und Hoffman, S. L. (2000): Improving protective immunity induced by DNA-based immunization: priming with antigen and GM-CSF-encoding plasmid DNA and boosting with antigen-expressing recombinant poxvirus, *J.Immunol.* (volume 164), issue 11, pp. 5905-5912. URL: PM:10820272
- Seder, R. A. und Hill, A. V. (2000): Vaccines against intracellular infections requiring cellular immunity, *Nature* (volume 406), issue 6797, pp. 793-798. URL: PM:10963610
- Selzer, P. M.; Marhöfer, R. J. und Rohwer, A. (2004): *Angewandte Bioinformatik - Eine Einführung*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Shirley, M. W. (1995): *Eimeria* species and strains of chickens, Eckert, J.; Brown, R.; Shirley, M. W. und Coudert, P., Cost 89/820 Biotechnology. Guidelines on techniques in coccidiosis research , European Comission, Brussels, Luxembourg.
- Shirley, M. W.; Ivens, A.; Gruber, A.; Madeira, A. M.; Wan, K. L.; Dear, P. H. und Tomley, F. M. (2004): The *Eimeria* genome projects: a sequence of events, *Trends Parasitol.* (volume 20), issue 5, pp. 199-201. URL: PM:15105014
- Sibley, L. D. (2004): Intracellular parasite invasion strategies, *Science* (volume 304), issue 5668, pp. 248-253. URL: PM:15073368
- Skeiky, Y. A.; Coler, R. N.; Brannon, M.; Stromberg, E.; Greeson, K.; Crane, R. T.; Webb, J. R.; Campos-Neto, A. und Reed, S. G. (2002): Protective efficacy of a tandemly linked, multi-subunit recombinant leishmanial vaccine (Leish-111f) formulated in MPL adjuvant, *Vaccine* (volume 20), issue 27-28, pp. 3292-3303. URL: PM:12213399
- Smith, A. L. und Hayday, A. C. (1998): Genetic analysis of the essential components of the immunoprotective response to infection with *Eimeria vermiformis*, *Int.J.Parasitol.* (volume 28), issue 7, pp. 1061-1069. URL: PM:9724877
- Smith, A. L. und Hayday, A. C. (2000a): An alphabeta T-cell-independent immunoprotective response towards gut coccidia is supported by gammadelta cells, *Immunology* (volume 101), issue 3, pp. 325-332. URL: PM:11106935
- Smith, A. L. und Hayday, A. C. (2000b): Genetic dissection of primary and secondary responses to a widespread natural pathogen of the gut, *Eimeria vermiformis*, *Infect.Immun.* (volume 68), issue 11, pp. 6273-6280. URL: PM:11035735
- Smith, A. L.; Rose, M. E. und Wakelin, D. (1994): The role of natural killer cells in resistance to coccidiosis: investigations in a murine model, *Clin.Exp.Immunol.* (volume 97), issue 2, pp. 273-279. URL: PM:8050176
- Smith, N. C.; Miller, C. M. D.; Petracca, M. und Eckert, J. (1995): Techniques for detecting immune responses of avian hosts, Eckert, J.; Brown, R.; Shirley, M. W. und Coudert, P., Cost 89/820 Biotechnology. Guidelines on techniques in coccidiosis research. European Comission, Brussels, Luxembourg.
- Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H.; Provenzano, M. D.; Fujimoto, E. K.; Goeke, N. M.; Olson, B. J. und Klenk, D. C. (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Anal.Biochem.* (volume 150), issue 1, pp. 76-85. URL: PM:3843705
- Smooker, P. M.; Setiady, Y. Y.; Rainczuk, A. und Spithill, T. W. (2000): Expression library immunization protects mice against a challenge with virulent rodent malaria, *Vaccine* (volume 18), issue 23, pp. 2533-2540. URL: PM:10775787
- Soldati, D.; Dubremetz, J. F. und Lebrun, M. (2001): Microneme proteins: structural and functional requirements to promote adhesion and invasion by the apicomplexan

parasite *Toxoplasma gondii*, Int.J.Parasitol. (volume 31), issue 12, pp. 1293-1302. URL: PM:11566297

Song, K. D.; Lillehoj, H. S.; Choi, K. D.; Yun, C. H.; Parcels, M. S.; Huynh, J. T. und Han, J. Y. (2000): A DNA vaccine encoding a conserved *Eimeria* protein induces protective immunity against live *Eimeria acervulina* challenge, Vaccine (volume 19), issue 2-3, pp. 243-252. URL: PM:10930679

Stahl, S.; Nygren, P. und Uhlen, M. (2004): Detection and isolation of recombinant proteins based on binding affinity of reporter, Tuan, R., Methods in Molecular Biology: Recombinant Gene Expression Protocols (volume 62), Humana Press, Totowa, New Jersey.

Stowers, A. W.; Kennedy, M. C.; Keegan, B. P.; Saul, A.; Long, C. A. und Miller, L. H. (2002): Vaccination of monkeys with recombinant *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 confers protection against blood-stage malaria, Infect.Immun. (volume 70), issue 12, pp. 6961-6967. URL: PM:12438375

Stüber, D.; Matile, H. und Garotta, G. (1990): System for high level production in *Escherichia coli* and rapid purification of recombinant proteins, Lefkovits, I. und Pernis, B., Immunological Methods. (volume 4), 1. edition, Academic Press, Orlando.

Su, Z. H.; Sato, Y. und Yamashita, O. (1993): Purification, cDNA cloning and northern blot analysis of trehalase of pupal midgut of the silkworm, *Bombyx mori*, Biochim.Biophys.Acta (volume 1173), issue 2, pp. 217-224. URL: PM:7916633

Sugawara, I. (2000): IL-18 and infectious diseases, with special emphasis on diseases induced by intracellular pathogens, Microbes.Infect. (volume 2), issue 10, pp. 1257-1263. URL: PM:11008115

Sung, Y. J.; Hotchkiss, J. H. und Dietert, R. R. (1994): 2,4-Diamino-6-hydroxypyrimidine, an inhibitor of GTP cyclohydrolase I, suppresses nitric oxide production by chicken macrophages, Int.J.Immunopharmacol. (volume 16), issue 2, pp. 101-108. URL: PM:7514157

Tabares, E.; Ferguson, D.; Clark, J.; Soon, P. E.; Wan, K. L. und Tomley, F. (2004): *Eimeria tenella* sporozoites and merozoites differentially express glycosylphosphatidylinositol-anchored variant surface proteins, Mol.Biochem.Parasitol. (volume 135), issue 1, pp. 123-132. URL: PM:15287593

Taft, R. A.; Denegre, J. M.; Pendola, F. L. und Eppig, J. J. (2002): Identification of genes encoding mouse oocyte secretory and transmembrane proteins by a signal sequence trap, Biol.Reprod. (volume 67), issue 3, pp. 953-960. URL: PM:12193407

Tang, D. C.; DeVit, M. und Johnston, S. A. (1992): Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response, Nature (volume 356), issue 6365, pp. 152-154. URL: PM:1545867

Tashiro, K.; Nakamura, T. und Honjo, T. (1999): The signal sequence trap method, Methods Enzymol. (volume 303), pp. 479-495. URL: PM:10349661

Tomley, F. M.; Billington, K. J.; Bumstead, J. M.; Clark, J. D. und Monaghan, P. (2001): EtMIC4: a microneme protein from *Eimeria tenella* that contains tandem arrays of epidermal growth factor-like repeats and thrombospondin type-I repeats, Int.J.Parasitol. (volume 31), issue 12, pp. 1303-1310. URL: PM:11566298

Tomley, F. M.; Bumstead, J. M.; Billington, K. J. und Dunn, P. P. (1996): Molecular cloning and characterization of a novel acidic microneme protein (Etmic-2) from the apicomplexan protozoan parasite, *Eimeria tenella*, Mol.Biochem.Parasitol. (volume 79), issue 2, pp. 195-206. URL: PM:8855556

Tomley, F. M.; Clarke, L. E.; Kawazoe, U.; Dijkema, R. und Kok, J. J. (1991): Sequence of the gene encoding an immunodominant microneme protein of *Eimeria tenella*, Mol.Biochem.Parasitol. (volume 49), issue 2, pp. 277-288. URL: PM:1775171

Torres, C. A.; Yang, K.; Mustafa, F. und Robinson, H. L. (1999): DNA immunization:

effect of secretion of DNA-expressed hemagglutinins on antibody responses, *Vaccine* (volume 18), issue 9-10, pp. 805-814. URL: PM:10580193

Towbin, H.; Staehelin, T. und Gordon, J. (1992): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979, *Biotechnology* (volume 24), pp. 145-149. URL: PM:1422008

Trout, J. M. und Lillehoj, H. S. (1996): T lymphocyte roles during *Eimeria acervulina* and *Eimeria tenella* infections, *Vet.Immunol.Immunopathol.* (volume 53), issue 1-2, pp. 163-172. URL: PM:8941977

Tsien, R. Y. (1998): The green fluorescent protein, *Annu.Rev.Biochem.* (volume 67), pp. 509-544. URL: PM:9759496

Ulmer, J. B.; Donnelly, J. J.; Parker, S. E.; Rhodes, G. H.; Felgner, P. L.; Dwarki, V. J.; Gromkowski, S. H.; Deck, R. R.; DeWitt, C. M.; Friedman, A. und . (1993): Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein, *Science* (volume 259), issue 5102, pp. 1745-1749. URL: PM:8456302

Vaidya, A. B. (2004): Mitochondrial and plastid functions as antimalarial drug targets, *Curr.Drug Targets.Infect.Disord.* (volume 4), issue 1, pp. 11-23. URL: PM:15032631

Vainio, O. und Ratcliffe, M. J. (1984): Proliferation of chicken peripheral blood leukocytes in response to pokeweed mitogen is macrophage dependent, *Cell Immunol.* (volume 85), issue 1, pp. 235-243. URL: PM:6608996

van der Lubben, I.; Verhoef, J. C.; Borchard, G. und Junginger, H. E. (2001): Chitosan for mucosal vaccination, *Adv.Drug Deliv.Rev.* (volume 52), issue 2, pp. 139-144. URL: PM:11718937

Varaldo, P. E.; Valisena, S.; Mingari, M. C. und Satta, G. (1989): Lysozyme-induced inhibition of the lymphocyte response to mitogenic lectins, *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* (volume 190), issue 1, pp. 54-62. URL: PM:2911608

Venkatesan, P. und Wakelin, D. (1993): ELISA's for parasitologists: or lies, damned lies and ELISA's, *Parasitol.Today* (volume 9), pp. 228-232.

Vercammen, M.; Scorza, T.; Huygen, K.; De Braekeleer, J.; Diet, R.; Jacobs, D.; Saman, E. und Verschueren, H. (2000): DNA vaccination with genes encoding *Toxoplasma gondii* antigens GRA1, GRA7, and ROP2 induces partially protective immunity against lethal challenge in mice, *Infect.Immun.* (volume 68), issue 1, pp. 38-45. URL: PM:10603366

Vermeulen, A. N. (1998): Progress in recombinant vaccine development against coccidiosis. A review and prospects into the next millennium, *Int.J.Parasitol.* (volume 28), issue 7, pp. 1121-1130. URL: PM:9724883

Vermeulen, A. N.; Schaap, D. C. und Schetters, T. P. (2001): Control of coccidiosis in chickens by vaccination, *Vet.Parasitol.* (volume 100), issue 1-2, pp. 13-20. URL: PM:11522402

Vitolo, M. und Borzani, W. (1983): Measurement of invertase activity of cells of *Saccharomyces cerevisiae*, *Anal.Biochem.* (volume 130), issue 2, pp. 469-470. URL: PM:6346948

Wallach, M.; Smith, N. C.; Petracca, M.; Miller, C. M.; Eckert, J. und Braun, R. (1995): *Eimeria maxima* gametocyte antigens: potential use in a subunit maternal vaccine against coccidiosis in chickens, *Vaccine* (volume 13), issue 4, pp. 347-354. URL: PM:7793129

Wang, X.; Jiang, P.; Deen, S.; Wu, J.; Liu, X. und Xu, J. (2003): Efficacy of DNA vaccines against infectious bursal disease virus in chickens enhanced by coadministration with CpG oligodeoxynucleotide, *Avian Dis.* (volume 47), issue 4, pp. 1305-1312. URL: PM:14708976

Wharton, K. A.; Johansen, K. M.; Xu, T. und Artavanis-Tsakonas, S. (1985): Nucleotide sequence from the neurogenic locus notch implies a gene product that



shares homology with proteins containing EGF-like repeats, *Cell* (volume 43), issue 3 Pt 2, pp. 567-581. URL: PM:3935325

Williams, R. B. (1998): Epidemiological aspects of the use of live anticoccidial vaccines for chickens, *Int.J.Parasitol.* (volume 28), issue 7, pp. 1089-1098. URL: PM:9724880

Witcombe, D. M.; Belli, S. I.; Wallach, M. G. und Smith, N. C. (2003): Molecular characterisation of EmTFP250: a novel member of the TRAP protein family in *Eimeria maxima*, *Int.J.Parasitol.* (volume 33), issue 7, pp. 691-702. URL: PM:12814649

Wolff, J. A.; Malone, R. W.; Williams, P.; Chong, W.; Acsadi, G.; Jani, A. und Felgner, P. L. (1990): Direct gene transfer into mouse muscle in vivo, *Science* (volume 247), issue 4949 Pt 1, pp. 1465-1468. URL: PM:1690918

Wu, S. Q.; Wang, M.; Liu, Q.; Zhu, Y. J.; Suo, X. und Jiang, J. S. (2004): Construction of DNA vaccines and their induced protective immunity against experimental *Eimeria tenella* infection, *Parasitol.Res.* URL: PM:15449177

Wu, Y.; Wang, X.; Csencsits, K. L.; Haddad, A.; Walters, N. und Pascual, D. W. (2001): M cell-targeted DNA vaccination, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (volume 98), issue 16, pp. 9318-9323. URL: PM:11459939

Yun, C. H.; Lillehoj, H. S. und Lillehoj, E. P. (2000): Intestinal immune responses to coccidiosis, *Dev.Comp Immunol.* (volume 24), issue 2-3, pp. 303-324. URL: PM:10717295

Zhang, N.; Zhang, J.; Purcell, K. J.; Cheng, Y. und Howard, K. (1997): The *Drosophila* protein Wunen repels migrating germ cells, *Nature* (volume 385), issue 6611, pp. 64-67. URL: PM:8985246

## 8 Publikationen und Tagungsbeiträge

### Tagungsbeiträge

C. Klotz, R. Lucius and T. Pogonka (2002), DNA immunization of chickens with the *Eimeria tenella* antigen SO7. Oral presentation at the "Joint Annual Meeting of the German and the Dutch Societies for Parasitology", Lübeck-Travemünde.

C. Klotz, R.J. Marhöfer, P.M. Selzer, R. Lucius, T. Pogonka (2003), Identification of secretory molecules of the coccidia parasite *Eimeria tenella* by parallel use of bioinformatic and experimental approaches. Oral presentation at the "96th meeting of the German Society for Zoology as a joint meeting with the German Society for Parasitology", Berlin.

C. Klotz, R. Lucius, T. Pogonka (2004), Identification of secretory antigens for the development of a subunit vaccine against coccidiosis. Oral presentation at the "21st Annual Meeting of the German Society for Parasitology", Würzburg. Int J Med Microbiol. 2004 Mar; 293 Suppl 38:44-117.

C. Klotz, R. Lucius, R. Marhöfer, P.Selzer, T. Pogonka (2004), Identification of secreted molecules by bioinformatic approaches. Oral presentation at the "21st Annual Meeting of the German Society for Parasitology", Würzburg. Int J Med Microbiol. 2004 Mar; 293 Suppl 38:44-117.

### Publikationen

T. Pogonka, C. Klotz, F. Kovacs, R. Lucius (2003), A single dose of recombinant *Salmonella typhimurium* induces specific humoral immune responses against heterologous *Eimeria tenella* antigens in chicken. Int J Parasitol. 2003 Jan; 33(1): 81-8.

C. Klotz, R. J. Marhöfer, P. M. Selzer, R. Lucius, T. Pogonka (2004), Identification of excretory/secretory and surface proteins from *Eimeria tenella* expressed sequence tags. Submitted.

C. Klotz, R. Lucius, T. Pogonka (2004), DNA vaccination of chickens with *Eimeria tenella* genes coding for the major surface protein TA4 and the refractile body antigen SO7. In preparation.

C. Klotz, R. Lucius, T. Pogonka (2004), Identification of genes encoding secreted proteins from the chicken parasite *Eimeria tenella* by functional complementation in Yeast. In preparation.